Arbeiten aus dem landwirtschaftlich-bakteriologischen Institut
der Universität Göttingen

Ueber Bakterien, welche die fraktionierte Sterilisation lebend überdauern

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Philosophischen Fakultät der Georg-August-Universität
zu Göttingen

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

vorgelegt von

Elisabeth Eckelmann
aus Osnabrück

Mit 6 Kurven und 2 Tafeln

Göttingen
Verlag von Gustav Fischer in Jena
1917

Angenommen von der mathematisch-naturwissenschaftlichen Abteilung der philosophischen Fakultät der Universität Göttingen.

Datum der mündlichen Prüfung: 6. Dez. 1916.

Referent: Prof. A. Koch.

Sonderabdruck aus dem Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. II. Abteilung. Herausgegeben von Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. O. Uhlworm in Berlin, Verlag von Gustav Fischer in Jena. 48. Band. 1918. Nr. 5/9

Meinen Eltern

gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548120_0052

Einleitung.

Einen Stoff bakterienfrei zu machen, gelingt z. B. mit Hilfe der Sterilisation durch Hitze, d. h. einer Erwärmung auf mehr oder minder hohe Temperatur. Im Laufe der Zeit haben sich, entsprechend den verschiedenen Eigenschaften der einzelnen Bakterienformen, mehrere solche Sterilisationsmethoden herausgebildet. Den meisten ist gemeinsam, daß man die zu sterilisierenden Substanzen der Einwirkung heißen Wasserdampfes aussetzt; denn es hat sich herausgestellt, daß ganz allgemein feuchte Hitze viel leichter lebendiges Plasma schädigt, als trockene.

Am einfachsten ist es natürlich, wenn man bei der Sterilisation den Wasserdampf ohne weiteres so benutzen kann, wie er sich beim Sieden des Wassers bildet, d. h. strömenden Wasserdampf von einer Temperatur von höchstens 100° C. Vegetative Bakterienzellen werden bei einer Behandlung mit solchem Wasserdampf binnen kurzer Zeit getötet. Bei allen denjenigen Formen, die keine Sporen bilden, wird also eine einmalige Sterilisation bei 100°, oder sogar bei tieferer Temperatur eine völlige Abtötung gewährleisten. Die Bakterien s p o r e n sind weit widerstandsfähiger. Immerhin werden sie bei vielen Arten getötet, wenn man die Dauer der Sterilisation bei 100° auf etwa 20 Minuten ausdehnt. Bei anderen Formen versagt diese Behandlung indessen vollkommen. Man kann ihre Sporen stundenlang dem strömenden Wasserdampf aussetzen, ohne daß sie die Keimkraft verlieren.

Hier greifen die beiden anderen Sterilisationsmethoden an: die fraktionierte Sterilisation und die Sterilisation unter Druck. Die letztere ist in der Technik, z. B. in der Konservenfabrikation, allgemein in Gebrauch. Prinzipiell unterscheidet sie sich von der einfachen Sterilisation nicht. Wie diese geht sie den direkten Weg, d. h. sie sucht alles vorhandene Bakterienmaterial auf einmal zu töten, gleichgültig, ob Sporen oder vegetative Zellen. Nur wird, mit Rücksicht auf die große Resistenz vieler Sporen, die Temperatur während des Sterilisationsprozesses höher gewählt, und zwar erzielt man die gewünschte Temperatur mit Hilfe von gespanntem Dampf im Autoklaven.

Ganz anders die fraktionierte Sterilisation. Sie fußt auf der schon erwähnten Tatsache, daß vegetative Zellen schon bei 100° in kürzester Zeit getötet werden. Man wiederholt deshalb die einfache Sterilisation im strömenden Dampf an 3 aufeinanderfolgenden Tagen, in der Annahme, daß innerhalb dieser Zeit nach und nach alle ursprünglich vorhandenen Sporen ausgekeimt und die vegetativen Zellen dann einer einfachen Sterilisation zugänglich wären. Dieses Verfahren wird in der Laboratoriumspraxis vielfach angewandt.

Es gibt indessen Fälle, wo auch diese beiden verbesserten Sterilisationsmethoden versagen. Oft genug finden sich in den Konservenindustrien verdorbene Büchsen, meistens schon äußerlich daran kenntlich, daß sie „bombieren", d. h. daß sie infolge von Gasentwicklung aufgetriebene Wandungen zeigen. Und wenn es sich dabei auch vielfach um Verunreinigungen infolge

von fahrlässiger Behandlung oder um mangelhafte Ausführung der Sterilisation handelt, so hat man doch verschiedentlich auch Bakterien von ungewöhnlicher Resistenz isolieren können. Das waren dann Formen, deren Sporen der angewandten Drucksterilisation — meistens einer solchen von 20 Minuten Dauer bei ca. 120° — Widerstand geleistet hatten.

Mit der Untersuchung derartiger Bakterien hat man sich schon des öfteren beschäftigt. Globig (8) untersuchte z. B. die Tötungszeit für den von ihm entdeckten roten Kartoffelbacillus, Bacillus mesentericus ruber, und gab darüber u. a. folgende Daten.

Die Sporen wurden getötet im gespannten Dampf:

Bei 109—113° nach 45 Minuten,
„ 113—116° „ 25 „
„ 122—123° „ 10 „
„ 126° „ 3 „

Christen (3) berichtet gleichfalls über solche Untersuchungen bei einer größeren Anzahl von Arten, die er auch genauer bestimmt. Er macht recht eingehende Mitteilungen über die Morphologie der betreffenden Bakterien, sowie besonders über deren Wachstum auf einer Anzahl verschiedener Nährböden. Zum Teil fand er äußerst widerstandsfähige Sporen. Nachfolgend einige Daten.

Die Sporen einiger sehr widerstandsfähiger Formen wurden getötet:

Bei 105—110° in 2—4 Stunden,
„ 115° „ 30—60 Minuten
„ 120° „ 5—15 „
„ 125—130° „ 5 „
„ 135° „ 1 Minute.

Wie zu erwarten war, ist die Tötungstemperatur also stets eine Funktion der Zeit.

Ähnliche Untersuchungen machten v. Esmarch (6) und C. von Wahl (13). Sie gingen außerdem zum erstenmal auf Schwankungen in der Resistenz ein und beschäftigten sich auch mit der Bedeutung des Mediums für die Widerstandsfähigkeit der Sporen. Dabei machten sie die interessante Feststellung, daß Antrocknen auf Erde die Resistenz günstig beeinflußt.

Dagegen war es zu Untersuchungen über Formen, welche der fraktionierten Sterilisation widerstehen, bisher noch nicht gekommen, und das Problem, ob sich diese Bakterien bei Anwendung von strömendem Wasserdampf von nicht mehr als 100° irgendwie unschädlich machen ließen, war noch völlig ungelöst.

Das sind die Fragen, mit denen sich die vorliegende Arbeit beschäftigen will.

Zunächst hatte ich zu fragen:

Warum versagt die fraktionierte Sterilisation?

Da sie eine Methode ist, welche den Verhältnissen der Bakterienkeimung besonders angepaßt ist, mußten es irgend welche Abweichungen bei dieser Keimung sein, die sie in den mir vorliegenden Fällen unwirksam machten. Die Vermutung lag nahe, daß entweder die Keimung der alten Sporen nach 3 Tagen noch nicht beendigt wäre, oder daß schon innerhalb 24 Stunden neue Sporen gebildet würden. Sollte sich eine dieser Annahmen als richtig erweisen, so mußte ich zweitens die Frage anschließen:

Wie läßt sich die fraktionierte Sterilisation abändern, um ganz allgemein eine Abtötung aller Bakterien zu gewährleisten?

Von großer Wichtigkeit war ferner die Beschaffung des Versuchsmaterials.

Da nach den Untersuchungen von C. von Wahl Erde anscheinend irgendwelche die Resistenz fördernden Eigenschaften hat, lag die Vermutung nahe, daß sich infolgedessen überhaupt in der Erde viele schwer sterilisierbare Bakterien finden würden. Auf Grund dieser Überlegung hatte man

im hiesigen Institut Versuche mit Nährlösungen gemacht, die mit Erde beimpft waren, und war dabei zu dem Ergebnis gekommen, daß solche Aufschwemmungen der fraktionierten Sterilisation widerstanden. Erde ist also anscheinend besonders reich an Bakterien, bei denen die fraktionierte Sterilisation versagt; ich werde sie im weiteren Verlauf dieser Arbeit als „schwer sterilisierbar" im engeren Sinne bezeichnen. Deshalb habe ich mir das nötige Material überwiegend aus Erdboden verschafft. Dabei war dann noch festzustellen, ob in allen Bodenarten solche „schwer sterilisierbaren" Bakterien vorkommen, und von systematischem Interesse war es, ob etwa diese Bakterien auch in weit getrennten Gebieten und sehr verschiedenen Bodenarten einem engen Verwandtschaftskreise angehören sollten. Schwer sterilisierbare Bakterien, die sich an anderen Orten fanden — in Milch war das verschiedentlich der Fall —, waren natürlich auch mit in den Kreis der Untersuchungen zu ziehen.

Mein Arbeitsplan im Einzelnen ergibt sich nach der oben von mir dargelegten Fragestellung: Zunächst beschaffte ich das erforderliche Material, isolierte die Bakterien in Reinkulturen und charakterisierte sie morphologisch wie physiologisch. Dann suchte ich Einblick in den Entwicklungsverlauf der vorliegenden Bakterien zu bekommen, insbesondere in die Verhältnisse der Keimung und Sporenbildung. Vor allen Dingen mußte ich klarlegen, nach welcher Zeit die Keimung eintrat, und innerhalb welchen Zeitintervalls sich die Bildung der Sporen vollzog. Endlich nahm ich, auf den Ergebnissen dieser Versuche fußend, systematisch Abänderungen der fraktionierten Sterilisation vor, um eine Methode zu finden, die in jedem Falle Abtötung der gesamten vorhandenen Bakterien sichert. Endlich suchte ich, von C. v. Wahls Erdversuchen ausgehend, festzustellen, welchen Einfluß die Wahl des Mediums auf die Resistenz, bzw. Keimung der Sporen hat.

Ausgangsmaterial.

Zu Beginn meiner Untersuchungen entnahm ich Erdproben von dem zum landwirtschaftlich-bakteriologischen Institut in Göttingen gehörigen Ackerland, gutem Lehmboden, etwa 10 cm unter der Oberfläche; außerdem von einem dort befindlichen Komposthaufen aus derselben Tiefe. Weiter bleibt bei fraktionierter Sterilisation von Milch stets ein mehr oder minder beträchtlicher Teil der Reagenzgläser unsteril. Derartige zersetzte Milch verwandte ich auch als Ausgangssubstanz. Wie die betreffenden schwer sterilisierbaren Bakterien in die Milch gelangen, ist mir nicht bekannt. Wahrscheinlich geraten sie vom Dünger oder Futter oder von der Hand der Melkenden die ja während der ländlichen Tagesarbeit vielfach mit Erde in Berührung kommt, an das Euter und von dort in die Milch.

Mit kleinen Mengen dieser 3 Substanzen impfte ich Röhrchen mit steriler Fleischbrühe (1 % Peptonzusatz). Dann sterilisierte ich die geimpften Reagenzgläser an 3 aufeinanderfolgenden Tagen 20 Min. lang im strömenden Dampf. In der Zwischenzeit wurden die Röhren bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Ein Versuch, sie bei höherer Temperatur zu halten, um dadurch die Keimung zu beschleunigen, mißlang hier, wie auch später bei Reinkulturen, da das Wachstum dann sofort mit solcher Lebhaftigkeit einsetzte, daß es vollkommen ausgeschlossen war, sie noch steril zu bekommen. Es ist ja eine schon des Öfteren festgestellte und auch von mir nachgeprüfte Tatsache, daß eine Sterilisation unmöglich wird, sobald das Bakterienwachstum einmal einen

ziemlich beträchtlichen Grad erreicht hat. Nach später zu erwähnenden Versuchsergebnissen ist wohl anzunehmen, daß es dann unter dem Einfluß der verschlechterten Ernährungsverhältnisse, wenigstens bei einem Teil der Bakterien, schon zur Sporenneubildung kommt. Und selbst die geringste Sporenzahl genügt ja bei schwer sterilisierbaren Formen, um jeden Sterilisationsversuch ergebnislos verlaufen zu lassen.

Nach der fraktionierten Sterilisation brachte ich die Röhrchen im Brutzimmer auf eine Temperatur von 35°. Schon am folgenden Tage war lebhaftes Wachstum schwer sterilisierbarer Bakterien eingetreten; makroskopisch erkennbar an Trübungen und Kahmbildung. Von diesen Röhrchen ausgehend, stellte ich dann durch wiederholtes Umimpfen auf Platten Reinkulturen her. Nach 5 Monaten — ich stelle dies Zeitintervall fest, weil es für meine späteren Ausführungen wesentlich ist, — zog ich auch noch andere, möglichst verschiedene Erdsorten zur Untersuchung heran, und zwar gleichfalls in der oben angegebenen Weise.

Ich benutzte:

I. aus der Umgebung von Osnabrück:
   1. Lehm aus einem Kalksteinbruch,
   2. schweren Ackerboden, Oberfläche,
   3. Sand von einem unbewachsenen Heidewege,
   4. Sand vom Rande eines Nadelwaldes,
   5. Humusboden aus demselben Nadelwalde,
   6. Humusboden aus Laubwald,
   7. moorigen Boden (Weideland);

II. aus der Umgegend von Nienburg a. W.
   8. und 9. Wesermarsch,
   10. Bruch;

III. aus der Umgebung von Oldenburg:
   11. Geest (Weideland),
   12. Geest (Ackerboden),
   13. Marsch (Weideland),
   14. anmoorige Marsch (Weideland),

Endlich zog ich noch

15. eine Bodenprobe von Ackerboden des Instituts heran, die seit 1903 trocken aufbewahrt worden war, um festzustellen, ob das Alter von Einfluß auf die Sterilisierbarkeit von Sporen ist, und

16. isolierte ich Bakterien aus einem weiteren verdorbenen Milchröhrchen.

Tatsächlich ergaben sich wesentliche Unterschiede. Als vollkommen frei von schwer sterilisierbaren Bakterien erwiesen sich auch bei wiederholten Kontrollversuchen bei makroskopischer und mikroskopischer Untersuchung — letztere nach 32 Tagen — die Bodenproben No. 3, 5 und 11. Worin das begründet liegen könnte, entzieht sich meiner Kenntnis. Meine ursprüngliche Vermutung, daß die betreffenden Böden saurer sein möchten als die anderen, erwies sich als nicht stichhaltig. Sandboden ist ja an sich bakterienarm; es hätte auch noch ganz verständlich sein können, daß Sand, auf dem gar keine Vegetation vorkommt, (3), auch in Bezug auf Bakteriengehalt versagt, mehr als ein anderer Sandboden (4). Dagegen ist es doch auffallend, daß dieser zweite Sandboden schwer sterilisierbare Bakterien liefert, während der dicht benachbarte Humusboden aus Nadelwald frei davon ist.

Sehr reich an Bakterien war übrigens auch der Sandboden No. 4 nicht. Makroskopisch und mikroskopisch ließ sich erst am 9. Tage nach der Sterilisation etwas stärkeres Wachtum nachweisen. Vereinzelte Stäbchen waren schon seit dem zweiten Tage aufgetaucht. Daß es sich um eine Folge geringerer Sporenzahl in der Flüssigkeit und nicht etwa um verspätete Keimung handelte, geht auch daraus hervor, daß bei späteren Umimpfungen mit größerer Sporenmenge das Bakterienwachstum viel früher makroskopisch wahrnehmbar wurde. Da in diesem Falle die Menge des Ausgangsmaterials an Sporen bedeutend größer war, hatten die Teilungen auch schneller so weit fortschreiten können, daß mit bloßem Auge die Anwesenheit der Bakterien festgestellt werden konnte.

Ebenfalls bakterienarm waren die Bodenarten No. 6 und No. 14, die erst am 9. Tage, No. 7, die am 8. Tage, No. 10 und No. 13, die am 6. Tage in der Nährlösung makroskopisch deutlich wahrnehmbares Wachstum zeigten.

Nährsubstrate.

Bei Sterilisationen benutzte ich zuerst immer die erwähnte Fleischbrühe mit Peptonzusatz; bei solchen in festem Nährboden dieselbe Fleischbrühe mit 10 Proz. Gelatinezusatz. Es ergab sich jedoch, wie schon bei früheren, im hiesigen Institut gemachten Untersuchungen (5), daß Gelatine die Keimung sehr zurückhält, sodaß dadurch bei Zählungen eine starke Fehlerquelle in die Resultate hineingebracht wurde. Da ich es außerdem vielfach mit verflüssigenden Bakterien zu tun hatte, zog ich später verschiedene Agarnährböden vor. Die Fleischbrühe mußte ich im Sommer 1916 durch Hefewasser (5—10 Proz.) ersetzen, weil infolge des Fleischmangels nicht die erforderlichen Mengen Fleischbrühe zu beschaffen waren. Da sich aber bei Parallelversuchen mit Hefewasser und Fleischbrühe keine Unterschiede im Wachstum ergaben, kann ich die mit beiden Nährböden erzielten Ergebnisse wohl als gleichwertig ansehen.

Zur physiologischen Untersuchung der einzelnen Bakterienformen verwandte ich verschiedene Substrate neben den schon erwähnten.

Außer 1—2 proz. Bouillon- und Molkenagar benutzte ich sogenannten Heydenagar, hergestellt unter Zusatz von Nährstoff Heyden:

12,5 g Agar,
7,5 g Nährstoff Heyden,
1 Liter Wasser.

Hesse und Niedner (9) haben bei Gelegenheit methodischer bakteriologischer Wasseruntersuchungen diesen Nährboden ganz besonders empfohlen. Sie haben darauf stets etwa 20 mal so viel Kolonien bekommen wie auf anderen Nährböden. Ganz im Gegensatz zu diesen Erfahrungen sagte aber sowohl dieser Heydenagar, wie auch ein entsprechend hergestelltes Heydenwasser den vor mir untersuchten Bakterien gar nicht zu.

Die flüssigen Nährböden variierte ich durch Zusatz von 2 Proz. Harnstoff, bezw. 2 Proz. Zucker, um den Abbau dieser Stoffe durch die Bakterien zu studieren und so die einzelnen Bakterienarten voneinander zu unterscheiden. Dabei ergab sich, daß in Hefewasser mit Zuckerzusatz viele Bakterien zur Farbstoffbildung neigten, was die Charakterisierung wesentlich erleichterte.

Endlich zog ich die Bakterien auch noch auf gekochten Kartoffeln, die ich in kleine Stücke zerschnitten und in Reagenzgläsern sterilisiert hatte.

Systematische morphologische und physiologische Untersuchung der isolierten Bakterien.

Es gelang mir, eine größere Anzahl schwer sterilisierbarer Bakterienformen zu isolieren, die aber alle einem engeren Verwandtschaftskreise anzugehören scheinen, da sich in wesentlichen Punkten ähnliche Eigenschaften nachweisen ließen. Ich habe die einzelnen Arten fortlaufend nummeriert. Als vollkommen identisch erwiesen sich aber Bakterien aus verschiedenen Böden im großen und ganzen nicht. Nur No. 14 fand ich in den Böden No. 1, No. 2, No. 4, No. 9 und No. 12 und das Bacterium No. 20 in den Böden No. 8 und No. 13. No. 14 scheint also an den verschiedensten Stellen vorzukommen, während sich No. 20 ja beide Male im Marschboden findet.

Wo nichts anderes angegeben wird, sind die Züchtungen bei einer Temperatur von 30—35° im Brutzimmer vorgenommen worden; nur die Untersuchungen in Gelatine erfolgten bei Zimmertemperatur (18°), weil die Gelatine sich sonst verflüssigt.

Hängetropfenkulturen habe ich sowohl im Brutzimmer als bei Zimmertemperatur gezüchtet. An dieser Stelle werde ich nur über die ersteren berichten. Über die letzteren wolle man p. 25 nachlesen. Ich habe sie dort eingeordnet, weil sie für die Ergebnisse meiner Arbeit von grundlegender Bedeutung waren.

Blieb in irgendeinem Falle makroskopisch wahrnehmbares Wachstum aus, so nahm ich nach mehreren Wochen eine mikroskopische Untersuchung vor. Lieferte auch diese ein negatives Ergebnis, so wurden noch Kontrollversuche angesetzt, ehe ich die endgültigen Feststellungen machte.

Die ersten 13 Bakterien sind diejenigen, die ich 5 Monate länger untersuchte, als die anderen, die ich also aus hiesigem Boden und aus dem ersten Milchröhrchen isolierte. In dieser einen Milchprobe fand ich die Formen 7—13 einschließlich, also nicht weniger als 7 verschiedene Bakterien. Eine so große Zahl ist mir an keiner Stelle sonst wieder begegnet.

Bei der Beschreibung der einzelnen Formen wolle man die beigegebenen Tafeln vergleichen. Die Nummern bei den einzelnen Abbildungen sind dieselben wie in der systematischen Beschreibung.

Die Größenmessungen erfolgten an lebenden Bakterien, die Längenangaben beziehen sich auf die Entfernung zwischen 2 sichtbaren Querwänden.

1.
Stäbchenform aus Komposterde.

1. Größe: 3 μ lang, 0,8 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Nach 3 Stunden ist ein Teil der Sporen gekeimt. Lebhaft bewegliche Einzelstäbchen mit abgerundeten Ecken durchqueren das Gesichtsfeld. Nach 19 Stunden hat die Beweglichkeit der Einzelstäbchen stark abgenommen. Zwischen ihnen liegen noch immer Sporen. Nach 24 Stunden finden sich neben schwach beweglichen Einzelstäbchen und zweigliedrigen Ketten vereinzelt längere Ketten mit bis zu 20 Gliedern, die unbeweglich sind. Großenteils haben sich in den Stäbchen Sporen gebildet. Die Sporen sind endständig, oval.

3. Bouillon: Nach einem Tage ist die ganze Flüssigkeit trübe, ohne daß Hautbildung stattgefunden hätte. Nach 3 Tagen hat sich ein weißlicher Kahm und ein Bodensatz entwickelt. Die Flüssigkeit ist jetzt klar.

4. Heydenwasser: Erst nach 1½ Wochen bildet sich eine stumpf weiße Haut. Die Flüssigkeit bleibt dauernd klar.

5. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Es bildet sich eine feste, weiße Haut. In der fast klaren Flüssigkeit schwimmen einzelne Flocken.

6. Schrägagar:

a) Heyden: Nach 1 Tage zeigt sich soeben beginnendes Wachstum in nächster

Nähe des Striches. Nach 4 Tagen hat sich eine dünne, weißliche, schmierige Schicht über die ganze Oberfläche des Nährbodens verbreitet.

b) Bouillon: Nach 1 Tage gleichmäßiges, kräftiges Wachstum dicht am Strich entlang. Nach 4 Tagen dick aufliegende, schmierige Verästelung.

7. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Nach 6 Tagen zeigt sich schwaches, büscheliges Wachstum dicht am Stichkanal entlang, aber erst etwas unterhalb der Oberfläche beginnend. Nach 10 Tagen ist der ganze Querschnitt 1 cm tief von feinen, horizontalen Verästelungen erfüllt. An der Oberfläche tritt konzentrisches Wachstum auf.

b) Gelatine: Nach 4 Tagen schwache Büschelbildung; am 7. Tage beginnt die Verflüssigung.

8. Gelatineplatten: Nach 6 Tagen sehr dichte, kleine, weiße Kolonien, die am 8. Tage verflüssigen.

Mikroskopisches Bild am 7. Tage: Unregelmäßige, aber scharf umrissene Kolonien mit kurzen Ausläufern. Die Mitte ist dunkler als der Rand.

9. Kartoffeln: Schwach rosa, schmierig; später gelblich.

2.

Stäbchenform aus Komposterde.

1. Größe: 2,5—3 μ lang, 0,7 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Nach 4 Stunden beginnt die Keimung, nach 19 Stunden liegen zahlreiche, ziemlich lange Ketten in dichtem Gewirr; dazwischen lebhaft bewegliche, abgerundete Einzelstäbchen. Nach 24 Stunden besteht Ähnlichkeit mit Form 1; es überwiegen jedoch die langen Fäden. Die Sporenbildung beginnt. Die Sporen sind endständig, oval.

3. Bouillon: Nach 1 Tage tritt eine leichte Trübung auf. Die Haut bildet noch keine zusammenhängende Decke, sondern schwimmt in einzelnen Fetzen auf der Oberfläche der Flüssigkeit. Nach 2 Tagen hängen von der zarten, fettglänzenden Kahmhaut dünne Schleier herab; außerdem hat sich ein Bodensatz gebildet. Die Flüssigkeit ist noch immer trübe. Nach 4 Tagen ist die Bouillon klar; im übrigen ist das Bild ungeändert.

4. Heydenwasser: Keinerlei Wachstum.

5. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Es bildet sich eine dicke, gelbe Haut; die Flüssigkeit ist trübe.

6. Schrägagar:

a) Heyden: Wie Form 1.

b) Bouillon: Wie Form 1.

7. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Wie Form 1.

b) Gelatine: Zuerst wie Form 1. Am 7. Tage tauchen aber einzelne Kolonien in allen Teilen des Nährbodens auf; dazu entstehen lebhafte Wucherungen auf der Oberfläche. Am 12. Tage beginnt die Verflüssigung.

8. Gelatineplatten: Nach 4 Tagen bilden sich besonders an der Oberfläche zahlreiche, kleine, feste Kolonien, die später weißgrau und verschwommen werden. Diese Form fängt erst am 14. Tage an, die Gelatine zu verflüssigen.

Mikroskopisches Bild am 7. Tage: Ein dunkler Kern ist von einem dichten Pelz von Ausläufern umgeben.

9. Kartoffeln: Wie Form 1.

Dies Bacterium zeigt ja in vielen Punkten Übereinstimmung mit Form 1. Indessen schienen mir die Unterschiede — besonders unter 2, 5 und 8 — zu bedeutend, als daß ich beide hätte identifizieren mögen. Ähnlich ist die Sachlage bei den beiden folgenden Formen.

3.

Stäbchenform aus Komposterde.

Dieses Bacterium hat nur etwa ⅔ der Größe von Form 1, unterscheidet sich sonst aber nur wenig von ihr:

Auf Gelatineplatten neigt es zur Bildung sekundärer Kolonien. Darunter versteht man die Erscheinung, daß innerhalb einer Kolonie sich einzelne Zellen lebhaft vermehren und dadurch neue, kleine Kolonien ausbilden, die sich dann als „Knöpfchen" von der Mutterkolonie abheben.

In Heydenwasser setzen nur einzelne kleine Kahmfetzen am Rande an.

In Hefewasser mit 2 Proz. Zucker tritt ein dicker, gelb und rot punktierter Kahm, sowie ein stark rosa gefärbter Bodensatz auf, bei gleichzeitiger Trübung der Flüssigkeit.

4.

Stäbchenform aus Ackererde.

Größe: 2—2,5 μ lang, 0,6 μ breit.

In Heydenwasser bleibt das Wachstum vollständig aus.

In Hefewasser mit 2 Proz. Zucker schwimmt nur wenig rein weißer Kahm auf der trüben Flüssigkeit.

Auf Gelatineplatten treten am 6. Tage große, dunkle Kolonien mit einem hellen Hof und einem Kranz feiner Ausläufer auf. Bald darauf beginnt die Verflüssigung.

5.

Stäbchenform aus Ackererde.

1. Größe: 2,5—3 μ lang, 0,6 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Nach 3 Stunden noch gar keine Keimung. Auch nach 19 Stunden ist erst der kleinere Teil der Sporen gekeimt. Es sind nur bewegliche, zarte Einzelstäbchen vorhanden von besonders langer, schmaler Form. Nach 24 Stunden kommen außerdem gelegentlich kurze, unbewegliche Ketten vor. Nach 2½ Tagen findet Sporenbildung statt. Die Sporen sind endständig, länglich.

3. Bouillon: Am 2. Tage zeigt sich eine gleichmäßige, schwache Trübung, die allmählich stärker wird, eine Haut bildet sich nie.

4. Heydenwasser: Ebenso.

5. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Die Flüssigkeit wird trübe und später zähflüssig. Schließlich bildet sich spärlich eine stumpf weiße Haut.

6. Schrägagar:

a) Heyden: Wie Form 1. Das Wachstum ist aber sehr schwach.

b) Bouillon: Ebenso.

7. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Wachstum zeigt sich nur in nächster Nähe des Stichkanals, und auch da kaum wahrnehmbar.

b) Gelatine: Am Stichkanal zeigt sich gar kein Wachstum. Am 7. Tage bildet sich eine Haut. Am 12. Tage wird die Gelatine verflüssigt.

8. Gelatineplatten: Am 6. Tage bilden sich feste, weiße Kolonien, die am 11. Tage verflüssigen.

Mikroskopisches Bild am 7. Tage: Die Kolonien sind dunkel und fest. Sie zeigen eine sehr charakteristische Ausbildung: Nach allen Seiten strahlen scharf konturierte, spitze Fortsätze aus, so daß das Ganze eher das Aussehen eines Kristallaggregates als eines organischen Gebildes hat.

9. Kartoffeln: Der trockene, zuerst weiß rosa gefärbte Schorf wird später gelbrot.

6.

Stäbchenform aus Ackererde.

1. Größe: 1,6—2 μ lang, 0,7 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Nach 12 Stunden ist ein großer Teil der Sporen gekeimt. Die kurzen, gedrungenen Stäbchen haben scharfe Ecken. Sie sind lebhaft beweglich. Nach 19 Stunden haben sich unbewegliche Ketten von wenigen Gliedern gebildet. Nach 24 Stunden beginnt die Sporenbildung. Die Sporen sind endständig, länglich.

3. Bouillon: Nach 1 Tage zeigt sich in der Flüssigkeit eine kräftige Trübung. Nach 2 Tagen beginnt vom Rande her schwacher Hautansatz; nach 5 Tagen ist die Kahmhaut zusammenhängend geworden. Fetzen hängen in die Flüssigkeit hinab, die jetzt klar ist. Außerdem hat sich ein gelblicher Bodensatz gebildet. Nach 7 Tagen ist das Bild dasselbe, aber die Flüssigkeit fängt an, sich von neuem zu trüben. Nach 12 Tagen ist diese Trübung wieder sehr stark geworden. Die Haut ist locker und goldgelb; auch der dicke Bodensatz ist gelb.

4. Heydenwasser: Geringe Trübung. Am Rande schwacher Kahmansatz.

5. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Die Kahmhaut ist dick und leuchtend goldgelb. Bodensatz und Flüssigkeit sind stark rosa.

6. Schrägagar:

a) Heyden: Wie Form 1.

b) Bouillon: Nach 1 Tage bilden sich an beiden Seiten des Striches wulstige Wucherungen, nach 4 Tagen liegen sie sehr dick auf und sind goldgelb.

7. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Nach 1 Woche tritt ziemlich starkes, horizontales Büschelwachstum auf, von dem aber die Oberfläche frei bleibt.

b) Gelatine: Nach 2 Tagen tauchen am Stichkanal voneinander isolierte Kolonien auf. Nach 4 Tagen haben sie sich schleierartig bis in die tiefsten Schichten verbreitet. Nach 7 Tagen wachsen isolierte, gelbe Kolonien in der Nähe des Bodens, während die in den oberen Schichten wieder verschwunden sind. Wahrscheinlich hat ein Hinabsinken in tiefere Schichten infolge beginnender Verflüssigung stattgefunden. Deutlich wird die Verflüssigung jedoch erst am 12. Tage.

8. Gelatineplatten: Am 3. Tage erscheinen kleine, weiße Kolonien, die später gelb werden. Am 9. Tage beginnt die Verflüssigung.

Mikroskopisches Bild am 6. Tage: Dick aufliegende, festumrandete, gelbe Kolonien mit einigen Ausläufern.

9. Kartoffeln: Das Wachstum ist nur lokal. Es bilden sich rosa gefärbte, schmierige Auflagerungen, die später gelblich und dann dunkelrot werden.

7.

Stäbchenform aus Milch.

1. Größe: 2,4—2,8 μ lang, 0,8 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Nach 4½ Stunden beginnt gerade die polare Keimung. Nach 18 und 21 Stunden sind schwach bewegliche, ziemlich große, scharfkantige Einzelstäbchen vorhanden. Nach 38 Stunden sind runde Sporen gebildet worden; die Sporen liegen endständig in den keulenförmig anschwellenden Stäbchen.

3. Bouillon: Nach 1 Tage tritt eine gleichmäßige Trübung auf. Nach 2 Tagen hat sich außerdem ein farbloser Bodensatz gebildet. Nach 4 Tagen zeigt sich eine dünne, weiße, strukturlose Haut. Nach 14 Tagen ist die Flüssigkeit wieder klar geworden. Die Haut ist stumpf weiß und leicht zerreißbar.

4. Heydenwasser: Kein Wachstum.

5. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Die Kahmhaut ist weiß und dünn, der Bodensatz aber besonders dick und voluminös.

6. Schrägagar:

a) Heyden: Kaum wahrnehmbares Wachstum.

b) Bouillon: Die Wucherungen sind weißlich, dick und wulstig. Sie sehen aus, als ob sie mit Mehl bestäubt wären.

7. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Schwaches Wachstum am Stichkanal entlang.

b) Bouillonagar: Wachstum findet sich hauptsächlich am Stichkanal entlang, in der Nähe der Oberfläche sind aber horizontale Verästelungen vorhanden. Außerdem bildet sich eine Kahmhaut.

c) Bouillongelatine: Nach 4 Tagen treten in oberen und unteren Schichten Schleier auf, in denen sich pünktchenförmige Kolonien unterscheiden lassen. Am 7. Tage bildet sich eine Haut. Nach 12 Tagen wird die Gelatine verflüssigt.

8. Gelatineplatten: Die nach 4 Tagen auftretenden kleinen, gelben Kolonien verflüssigen bald die ganze Gelatine.

Mikroskopisches Bild am 6. Tage: Kleine, dick aufliegende, zerfließende, gelbe Kolonien.

9. Kartoffeln: Rotgelbe, schmierige Wucherungen breiten sich über die ganze Oberfläche aus.

8.

Stäbchenform aus Milch.

1. Größe: 2,7—3 μ lang, 0,8 μ b eit.

2. Hängetropfenkultur: Nach 4½ Stunden beginnt die Keimung. Nach 18 Stunden sind die dicken Einzelstäbchen in lebhafter Bewegung. Nach 25 Stunden haben sich außerdem ziemlich dicke, gedrungene, unbewegliche Ketten gebildet. Nach 1½ Tagen sind noch immer Ketten und Einzelstäbchen vorhanden. Nach 2 Tagen beginnt die Sporenbildung. Die Sporen sind endständig, rund, die Stäbchen vor und während der Sporenbildung keulenförmig angeschwollen.

3. Bouillon: Nach 1 Tage ist die Flüssigkeit stark getrübt. Nach 2 Tagen hat sich außerdem ein Bodensatz gebildet. Eine Kahmhaut kommt nicht vor.

4. Heydenwasser: Trübung.

5. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Die Kahmhaut ist gelb, die Flüssigkeit trübe und fadenziehend, der Bodensatz weiß.

6. Schrägagar:

a) Heyden: Nach 2 Tagen zeigt sich in einer einzigen Kultur eine winzige Kolonie mit schwacher Verästelung.

b) Bouillon: Nach 1 Tage ist die Wucherung unregelmäßig, flächenhaft, matt weiß, rissig, an einigen Stellen feucht. Das Bild bleibt dauernd dasselbe.

7. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Nur schwaches Wachstum dicht am Stichkanal.

b) Bouillonagar: Wie a), aber außerdem eine fein gefaltete, zarte Haut.

c) Bouillongelatine: Am 7. Tage ist die Gelatine schwach getrübt; Einzelkolonien lassen sich aber nicht erkennen. Am 12. Tage beginnt die Verflüssigung.

8. Gelatineplatten: Auch mikroskopisch sind in der getrübten Platte keine Einzelkolonien erkennbar. Am 4. Tage tritt Verflüssigung ein.

9. Kartoffeln: Rotgelbe, schmierige Wucherungen.

9.

Stäbchenform aus Milch.

1. Größe: 2,5 μ lang, 0,8 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Nach 4½ Stunden liegen zwischen den zahlreichen Sporen mittelgroße, kräftige Stäbchen, die in der Mitte etwas dicker sind, als an den Enden. Ihre Beweglichkeit ist gering. Einzelne kurze Ketten mit 3—4 Gliedern kommen vor; sie sind unbeweglich. Nach 18 Stunden sind die Ketten häufiger. Nach 1½ Tagen haben viele Stäbchen Sporen gebildet; auch die Ketten, ohne zu zerfallen. Die Sporen sind endständig, rund.

3. Bouillon: Nach 1 Tage ist die Flüssigkeit trübe. Nach 2 Tagen ist die Trübung jedoch wieder verschwunden; am Rande beginnt Hautansatz. Nach 4 Tagen ist die Kahmhaut zusammenhängend geworden. Sie ist kraus, weiß und paraffinähnlich. Nach 5 Tagen liegen auf der Hauptmasse der Haut kräftige, aber sehr zierliche Verästelungen.

4. Heydenwasser: Trübung.

5. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Die weiße Haut ist nur schwach ausgebildet, die Flüssigkeit trübe, der Bodensatz etwas rosa.

6. Schrägagar:

a) Heyden: Nach 2 Tagen ist die Oberfläche dicht am Strich entlang von einer gleichmäßigen, mattweißen Schicht bedeckt.

b) Bouillon: Das Aussehen ist ähnlich. Manche Stellen sind aber feucht glänzend.

7. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Nach 2 Tagen liegen einzelne dicke Knöpfchen in der Nähe des Stichkanals.

b) Bouillonagar: Schwaches Wachstum dicht am Stichkanal. Außerdem eine dicke, wulstige Haut.

c) Bouillongelatine: Nach 4 Tagen reichen Schleier, in denen die Einzelkolonien erkennbar sind, bis auf den Boden des Röhrchens. Am 12. Tage tritt Verflüssigung ein.

8. Gelatineplatten: Ganz vereinzelt bilden sich runde, weiße Kolonien ohne charakteristische Ausbildung. Nach 8 Tagen erfolgt Verflüssigung.

9. Kartoffeln: Rotgelbe, schmierige Auflagerungen, die später rosa werden.

10.

Stäbchenform aus Milch.

1. Größe: 2,2—2,5 μ lang, 0,6—0,7 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Nach 4½ Stunden beginnt die Keimung, und zwar polar. Es bilden sich zarte, wenig bewegliche, mittelgroße Stäbchen. Nach 17 Stunden sind außerdem etwas bewegliche, kurze Ketten entstanden. Nach 21 Stunden sind die Ketten unbeweglich geworden. Sie sind jetzt äußerst lang und vielfach verschlungen. Nach 2 Tagen tritt Sporenbildung ein. Die Sporen sind endständig, rund.

3. Bouillon: Nach 1 Tage Trübung. Die Hautbildung ist noch schwach. Nach 2 Tagen sieht der jetzt dichte Kahm punktiert aus. Außerdem schwimmt in der Nähe des Bodens ein horizontaler Schleier. Die Flüssigkeit ist klar.

4. Heydenwasser: Trübung.

5. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Die Flüssigkeit ist fast klar. Die nur schwach ausgebildete Haut sieht weißgelb aus.

6. Schrägagar:

a) Heyden: Das Wachstum ist kräftiger als bei den anderen Formen. Es sind auch starke Verästelungen vorhanden.

b) Bouillon: Nach 1 Tage bilden sich wulstige Auflagerungen mit kleinen Seitenverästelungen. Nach 2 Tagen liegen diese Verzweigungen dick auf; sie sind mattweiß und stellenweise etwas feucht.

7. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Das Wachstum erfolgt zwar auch nur am Stichkanal entlang, aber lebhafter als bei den übrigen Formen.

b) Bouillonagar: Am oberen Ende zeigen sich bürstenartige, sehr dichte Verästelungen. Der sehr dicke und wulstige, weiße Kahm wird später bräunlich und runzelig.

c) Bouillongelatine: Am 4. Tage beginnt das Wachstum in der Nähe der Oberfläche. Nach 7 Tagen tritt außer der Haut eine gleichmäßige Trübung auf. Nach 12 Tagen wird die Gelatine verflüssigt.

8. Gelatineplatten: Nach 4 Tagen bilden sich äußerst kleine, weiße, runde Kolonien, die aber selbst bei mikroskopischer Betrachtung keine charakteristische Ausbildung zeigen. Nach 9 Tagen tritt Verflüssigung ein.

9. Kartoffeln: Dicke, weiche Haut von grauer Farbe.

11.
Stäbchenform aus Milch.

1. Größe: 2,8—3 μ lang, 0,7—0,8 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Nach 4½ Stunden beginnt die Keimung. Die ziemlich großen Stäbchen haben scharfe Ecken. Sie sind langsam beweglich. Nach 21 Stunden haben sich kurze Ketten gebildet. Nach 25 Stunden sind die Ketten etwas länger und vielfach geknickt. Die Beweglichkeit ist verschwunden. Nach 1½ Tagen tritt Sporenbildung auch in den Ketten ein. Die Sporen sind endständig, rund.

3. Bouillon: Nach 1 Tage zeigt sich eine schwache Trübung, die später kräftiger wird. Erst nach 12 Tagen bildet sich eine zarte Haut und etwas Bodensatz.

4. Heydenwasser: Kein Wachstum.

5. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Wie Form 8.

6. Schrägagar:

a) Heyden: Nach 2 Tagen zieht sich ein schmaler, feuchter Streifen auf der Oberfläche am Strich entlang. Außerdem wachsen zahlreiche Einzelkolonien auch in tieferen Schichten.

b) Bouillon: Nach 1 Tage liegen in der Nähe des Striches zahlreiche, knöpfchenartige Einzelkolonien. Nach 2 Tagen ist die Oberfläche zusammenhängend geworden. Sie ist mattweiß und glatt. Nur am oberen Ende hat sie wulstige Erhebungen.

7. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Fast gar kein Wachstum.

b) Bouillonagar: Das Tiefenwachstum ist nur schwach. An der Oberfläche bildet sich eine zarte, feingefaltete Haut.

c) Bouillongelatine: Nach 2 Tagen tritt eine weiße Haut auf, während in tieferen Schichten das Wachstum noch vollständig ausbleibt. Nach 7 Tagen beginnt eine schwache Trübung der oberen Schichten, nach 12 Tagen sind einzelne Kolonien durch die ganze Gelatine verstreut, ohne daß der Stichkanal dabei irgendwie bevorzugt schiene. Nach 14 Tagen wird die Gelatine verflüssigt.

8. Gelatineplatten: Nach 3 Tagen bilden sich charakteristische, dick aufliegende, gelbe Köpfchen. Nach 13 Tagen wird die Gelatine verflüssigt.

Mikroskopisches Bild am 7. Tage: Die Kolonien sind dick, schmierig, fest umrandet. Die älteren zerfließen etwas.

9. Kartoffeln: Das Bacterium wächst auf diesem Nährboden nur schwach. Es bildet einen trockenen, weißen Schorf, der später rotbraun wird.

12.
Stäbchenform aus Milch.

1. Größe: 2,7—2,9 μ lang, 0,6—0,8 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Nach 4½ Stunden liegen zwischen den Sporen unbewegliche Einzelstäbchen mit scharfen Ecken. Nach 25 Stunden ist das Bild ähnlich wie bei Form 11. Die Ketten sind aber sehr kurz. Nach 34 Stunden sind sie von neuem in Einzelstäbchen zerfallen. Nach 2 Tagen werden Sporen gebildet. Die Sporen sind endständig, etwas länglich.

3. Bouillon: Nach 2 Tagen zeigt sich eine zarte, weiße Haut, von der Schleier herabhängen. Später wird sie dicker und glänzt wie Paraffin.

4. Heydenwasser: Kein Wachstum.

5. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Die Haut ist rosa punktiert. Der Bodensatz ist weißrosa und auch die getrübte Flüssigkeit ist rosa gefärbt.

6. Schrägagar:

a) Heyden: Am Strich entlang bildet sich ein schmaler, mattweißer Streifen.

b) Bouillon: Nach 1 Tage begleiten den Strich breit zerfließende Einzelkolonien.

7. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Wenig Wachstum.

b) Bouillonagar: Wie Form 10.

c) Bouillongelatine: Nach 4 Tagen treten in der Nähe des Stichkanals zarte Schleier auf. Am 7. Tage Verflüssigung der Gelatine.

8. Gelatineplatten: Nach 3 Tagen bilden sich sehr kleine, weiße Knöpfchen. Nach 6 Tagen fängt die Gelatine an, sich zu verflüssigen.

Mikroskopisches Bild am 6. Tage: Winzige, dunkle Kolonien mit einem lockeren Kranze von Ausläufern.

9. Kartoffeln: Dunkelbrauner, trockener Schorf.

13.
Stäbchenform aus Milch.

1. Größe: 2,6—3 μ lang, 0,4—0,6 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Nach 4½ Stunden ist ein Teil der Sporen gekeimt. Die schlanken Stäbchen sind beweglich. Nach 21 Stunden haben sie ihre Beweglichkeit verloren. Vereinzelt finden sich Ketten bis zu beträchtlicher Länge. Nach 34 Stunden haben sich in den Stäbchen Sporen gebildet. Die Sporen weichen im Bau von allen von mir untersuchten, wie auch von allen mir sonst bekannten Formen ab. Ich nahm deshalb eine genaue Messung vor. Sie sind 0,7—0,8 μ lang und höchstens 0,2 μ breit. Infolgedessen sehen sie äußerst lang und schmal aus und erwecken den Eindruck, als ob sie seitlich zusammengedrückt wären. Im Stäbchen entstehen sie endständig.

3. Bouillon: Nach 1 Tage ist die Flüssigkeit trübe. Später wird sie aber klar, und es bildet sich eine zarte Haut und etwas Bodensatz.

4. Heydenwasser: Abweichend von den meisten anderen Formen, bleibt hier die Flüssigkeit klar, und es bildet sich etwas Haut.

5. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Die Hautbildung ist nur schwach. Die Kahmhaut hat rosa Farbe, der Bodensatz und die Flüssigkeit rein weiße.

6. Schrägagar:

a) Heyden: Kein Wachstum.

b) Bouillon: Nach 1 Tage sind ziemlich viele, feucht verschwommene Einzelkolonien entstanden. Nach 2 Tagen hat sich eine zusammenhängende, mattweiße Oberflächenschicht von geringer Dicke gebildet. Stellenweise ist sie faltig zusammengezogen und trocken bestäubt.

7. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Durch das ganze Substrat verstreut liegen Einzelkolonien.

b) Bouillonagar: Das Wachstum ist nicht sehr stark, aber sehr gleichmäßig durch obere und untere Schichten verteilt.

c) Bouillongelatine: Sehr schwaches Wachstum in Einzelkolonien, und zwar nur an der Oberfläche. Am 12. Tage Verflüssigung.

8. Gelatineplatten: Nach 6 Tagen erscheinen kleine, feste Kolonien. Nach 10 Tagen Verflüssigung der Gelatine.

Mikroskopisches Bild nach 8 Tagen: Die Kolonien sind locker und von brauner Farbe. Sie haben einen unregelmäßigen, aber scharf umrissenen Rand.

9. Kartoffeln: Wie Form 12.

Nun komme ich zu den Bakterien, die ich nur kürzere Zeit untersuchte und die großenteils aus auswärtigem Boden stammten. Da sich die Untersuchung in Heydenwasser als nicht besonders charakteristisch erwiesen hatte, ließ ich sie fort. Auch beschränkte ich mich bei den Stichkulturen auf nur einen Agarnährboden, da sich zwischen beiden wesentliche Unterschiede bisher nicht ergeben hatten.

Von Interesse war es, daß sich aus dem Boden No. 15, der lange trocken aufbewahrt worden war, schwer sterilisierbare Bakterien isolieren ließen, die in ihrem Verhalten in keiner Weise von den anderen abwichen. Selbst ein Alter von einer beträchtlichen Anzahl von Jahren ist also nicht von Einfluß auf die Schwersterilisierbarkeit der Sporen.

14.

Stäbchenform aus Boden No. 1.

1. Größe: 2 μ lang, 0,6 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Nach 6 Stunden ist die Mehrzahl der Sporen gekeimt. Die Stäbchen sind kurz und beweglich und haben abgerundete Ecken. Gelegentlich kommen zweigliedrige Ketten vor. Nach 26 Stunden trägt ein Teil der jetzt unbeweglichen Stäbchen ziemlich am Ende eine längliche Spore, die etwas schräg liegt. Nach 31 Stunden ist die Sporenbildung allgemein. Die Sporen sind teilweise frei.

3. Bouillon: Nach 1 Tage ist die Flüssigkeit stark getrübt. Nach 2 Tagen bildet sich eine eigenartige, fettige, zerrissene Haut. In der Flüssigkeit schwimmen Flocken.

4. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Die Haut ist gelblich, der Bodensatz weiß, die Flüssigkeit trübe.

5. Schrägagar:

a) Heyden: Nach 2 Tagen zeigen sich in der Nähe des Striches weiße Wucherungen von ziemlicher Dicke, die in größerer Entfernung vom Striche immer dünner werden. Nach 5 Tagen sind die mittleren Teile feucht glänzend, die äußeren trockener.

b) Bouillon: Nach 1 Tage ist die Oberfläche farblos, durchsichtig, glatt, wie glasiert. Nach 2 Tagen ist die Farbe gelblich geworden; sonst lassen sich keine Änderungen feststellen. Nach 5 Tagen ebenso wie auf Heydenagar.

6. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Nach 5 Tagen bildet sich ein allmählich nach unten verlaufender Schleier. Nach 14 Tagen reicht 2 cm tief eine kompakte, scharf umgrenzte, zylindrische Masse, die aber nicht den ganzen Querschnitt durchsetzt. An der Oberfläche bildet sich eine strahlige Kahmhaut.

b) Gelatine: Nach 4 Tagen zieht sich am Stichkanal hinab ein flach zusammengedrückter, zarter Schleier, in dem die Einzelkolonien erkennbar sind. Zahlreiche isolierte Kolonien sind außerdem durch die ganze Gelatine verteilt. Nach 7 Tagen hat der Schleier eine deutlich keilförmige Gestalt angenommen und wird nach unten hin durch vereinzelte Kolonien noch fortgesetzt.

7. Gelatineplatten: Am 3. Tage bilden sich feuchte, kleine Kolonien, nach 5 Tagen hat sich die Feuchtigkeit jedoch verloren. Nach 11 Tagen Verflüssigung.

Mikroskopisches Bild nach 5 Tagen: Kleine Kolonien mit unregelmäßigen Konturen und runzliger Oberfläche.

8. Kartoffeln: Zunächst ist der trockene Schorf weiß, stellenweise gelb. Im Alter wird er braungelb.

15.

Stäbchenform aus Boden No. 2.

1. Größe: 2,2—2,5 μ lang, 0,7 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Nach 6 Stunden ist etwa die Hälfte der Sporen gekeimt (vgl. Form 18). Nach 26 Stunden sind Ketten mit bis zu 5 Gliedern gebildet worden. Obwohl in den sehr kurzen Stäbchen schon Sporen liegen, sind sie noch beweglich. Die länglichen Sporen befinden sich ungefähr in der Mitte der Stäbchen.

3. Bouillon: Nach 2 Tagen bildet sich über der klaren Flüssigkeit eine zarte, stumpfweiße Haut. Nach 7 Tagen ist sie dick und goldgelb geworden.

4. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Haut, Flüssigkeit und Bodensatz sind schwach gelb.

5. Schrägagar:

a) Heyden: Erst nach 5 Tagen entsteht eine gleichmäßige, mattweiße Oberflächenschicht. Nach 14 Tagen kommen bäumchenartige Verzweigungen hinzu, die aber sehr schwach bleiben.

b) Bouillon: Das Bild ist dasselbe; doch bildet sich die gleichmäßige Schicht schon am 2., die Verzweigung schon am 7. Tage.

6. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Nach 2 Tagen bildet sich dicht unter der Oberfläche ein dichter Schleier. Tiefenwachstum fehlt. Nach 14 Tagen tritt außerdem eine gleichmäßige Trübung des ganzen Substrates auf.

b) Gelatine: Nach 4 Tagen zieht sich am Stichkanal entlang ein flacher, gelblicher Schleier, an dessen Rande sich nach 7 Tagen Einzelkolonien absondern. Die Gelatine bleibt dauernd fest.

7. Gelatineplatten: Nach 3 Tagen fängt das Wachstum an. Nach 5 Tagen sind die Kolonien größer geworden. Sie stehen sehr dicht und sind etwas gelblich.

Mikroskopisches Bild am 5. Tage: Die Oberflächenkolonien liegen dick auf und haben einen unregelmäßigen Rand. Im Innern liegen kleine, kreisrunde, glänzende Kolonien.

8. Kartoffeln: Anfangs gelbbraun und feucht, später stark gerunzelt, von rein brauner Farbe.

16.

Stäbchenform aus Boden No. 4.

1. Größe: 1,6—1,9 μ lang, 0,7—0,8 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Nach 6 Stunden teilweise Sporenkeimung. Kurze, gedrungene, wenig bewegliche Stäbchen mit abgerundeten Ecken. Nach 26 Stunden haben sich in den Stäbchen, die etwas Beweglichkeit behalten haben, beinahe in der Mitte sehr große, längliche Sporen gebildet. Nach 31 Stunden ist der größte Teil der Sporen frei.

3. Bouillon: Nach 1 Tage ist die Flüssigkeit etwas trübe. Die Haut ist zart und stumpf weiß. Nach 2 Tagen ist die Flüssigkeit klar geworden, die Haut aber unverändert geblieben. Nach 3 Tagen erscheint die Trübung von neuem.

4. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Wie Form 14.

5. Schrägagar:

a) Heyden: Nach 2 Tagen erscheinen in der Nähe des Striches dicke, gelbe, etwas wulstige Wucherungen, die seitlich bäumchenartig verzweigt sind. Nach 5 Tagen ist das Ganze von goldgelber Farbe, während die Verzweigungen anfangs weiß gefärbt waren. Nach 14 Tagen wechseln goldgelbe, braune und weiße Streifen unregelmäßig miteinander ab. Die Ausbildung ist sehr charakteristisch.

b) Bouillon: Gleichmäßige, trockene, glatte Oberfläche von mattweißer Farbe.

6. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Nach 5 Tagen verläuft ein dünner Schleier allmählich nach unten. Die kräftige Haut ist strukturlos. Nach 14 Tagen ist die Haut noch immer unverändert; der Schleier ist dagegen weitergewachsen und trübt das ganze Substrat.

b) Gelatine: Nach 4 Tagen entsteht ein flach zusammengedrückter, zarter Schleier. Nach 7 Tagen hat er sich in dicht gelagerte, gelbe Einzelkolonien aufgelöst. Die unteren Kolonien sind viel größer als die oberen.

7. Gelatineplatten: Nach 3 Tagen beginnt das Wachstum. Nach 5 Tagen ist das Aussehen wie bei Form 14. Verflüssigung findet nicht statt.

8. Kartoffeln: Goldgelbe, feuchte Wucherungen, deren Farbe später stumpfer und endlich schmutzig gelbbraun wird.

17.

Stäbchenform aus Boden No. 6.

1. Größe: 2,6—2,9 μ lang, 0,4—0,5 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Nach 6 Stunden ist etwa die Hälfte der Sporen gekeimt. Die sehr langen, dünnen Stäbchen haben scharfe Ecken. Beweglichkeit ist kaum wahrnehmbar. Sie bilden schon ziemlich lange, zarte Ketten. Nach 26 Stunden haben sich in den Stäbchen sehr kleine, längliche Sporen endständig entwickelt. Nach 31 Stunden sind sie größtenteils frei.

3. Bouillon: Nach 1 Tage ist die sehr zarte Haut stumpf weiß gefärbt. Durch die klare Flüssigkeit zieht sich ein Schleier. Nach 2 Tagen ist die Haut fest und runzelig geworden. Die Farbe ist noch immer weiß. Nach 7 Tagen ist sie jedoch rosa geworden.

4. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Es besteht Ähnlichkeit mit Form 12; aber Haut und Bodensatz sind viel stärker rosa.

5. Schrägagar:

a) Heyden: Nach 2 Tagen wachsen dünn verteilt am Strich entlang zahlreiche weiße Einzelkolonien. Nach 5 Tagen sind sehr zarte, feuchte, bäumchenartige Verzweigungen hinzugekommen.

b) Bouillon: Die nach 1 Tage mattweiße glatte Oberfläche fängt nach 2 Tagen an, sich etwas in der Nähe des Striches vorzuwölben. Nach 5 Tagen ist sie stellenweise trocken glasiert.

6. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Nach 5 Tagen beginnt bäumchenartiges Radialwachstum mit horizontalen Zweigen. Die oberen sind viel breiter als die unteren. Nach 14 Tagen ist der ganze Agar parallel zu den einzelnen Zweigen zerklüftet.

b) Gelatine: Nach 7 Tagen Schleierbildung; nach 11 Tagen Verflüssigung.

7. Gelatineplatten: Nach 6 Tagen bilden sich einzelne dunkle Kolonien.

Mikroskopisches Bild nach 8 Tagen: Um einen dunklen Kern liegt ein heller, sich vielfach windender Hof mit sehr unregelmäßigen Umrissen. Nach 10 Tagen Verflüssigung der Gelatine.

8. Kartoffeln: Es bildet sich ein Schorf, der ursprünglich dick und weiß ist, bald aber gleichmäßig grau gefärbt wird.

18.

Stäbchenform aus Boden No. 7.

1. Größe: 2—2,3 μ lang, 0,6—0,7 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Nach 6 Stunden ist erst der kleinere Teil der Sporen gekeimt. Die Stäbchen ähneln denen von Form 14, sind aber etwas plumper. Sie bewegen sich nur langsam vorwärts. Nach 26 Stunden sind sie unbeweglich geworden. Die hintere Hälfte der Stäbchen ist fast ganz von der sehr großen, ovalen Spore ausgefüllt.

3. Bouillon: Nach 1 Tage ist die Flüssigkeit klar. Die Haut besteht aus einzelnen Flocken. Nach 2 Tagen ist sie fest und runzelig geworden.

4. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Wie Form 12.

5. Schrägagar:

a) Heyden: Nach 1 Tage sehen die weißen Wucherungen in der Nähe des Striches beinahe wie Schimmel aus. In tieferen Schichten liegen vereinzelte Kolonien. Das Bild bleibt dauernd dasselbe.

b) Bouillon: Nach 1 Tage ist die Oberfläche glatt, weiß, punktiert, wie mit einer Glasur überzogen. Nach 5 Tagen ist das Bild ähnlich wie bei 14; aber die Wucherungen sind kräftiger, und die Färbung ist reiner weiß.

6. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Nach 5 Tagen bildet sich etwas Haut. Nach 14 Tagen sind außerdem die obersten Schichten horizontal zerklüftet.

b) Gelatine: Nach 7 Tagen beginnt das Wachstum soeben, und zwar in Form lockerer Schleier. Nach 10 Tagen Verflüssigung.

7. Gelatineplatten: Nach 5 Tagen treten ganz vereinzelt ziemlich große Kolonien auf. Nach 7 Tagen sind sie sehr groß geworden. Um einen dunklen Kern sondern sie einen hellen Hof ab. Nach 10 Tagen Verflüssigung.

Mikroskopisches Bild nach 7 Tagen: Außer der Größe keine Unterschiede von Form 14.

8. Kartoffeln: Zuerst bildet sich ein weicher grauer Überzug, der dicht mit Flüssigkeitstropfen besetzt ist. Dann wird er leuchtend rosa, endlich schmutzig rotgelb.

19.

Stäbchenform aus Boden No. 8.

1. Größe: 2,5—2,8 μ lang, 0,4—0,5 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Die langen, zarten Stäbchen haben Ähnlichkeit mit denen von Form 17. Aber sie sind nach 6 Stunden noch nicht so zahlreich wie jene; auch ist die Kettenbildung noch längst nicht so weit fortgeschritten. Nach 26 Stunden sind endständig runde Sporen gebildet worden, die nach 31 Stunden frei sind.

3. Bouillon: Nach 1 Tage schwimmt auf der klaren Flüssigkeit ein flockiger Kahm, der nach 2 Tagen fest und runzelig geworden ist. Nach 3 Tagen sieht er paraffinartig aus; die Flüssigkeit ist ziemlich stark trübe geworden.

4. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Wie Form 12, aber weniger stark rosa.

5. Schrägagar:

a) Heyden: Nach 1 Tage schimmelähnliche Wucherungen, die nach 5 Tagen sehr dick geworden sind. In tieferen Schichten bilden sich sehr dichte Bäumchen.

b) Bouillon: Nach 1 Tage liegt auf der Flüssigkeit eine mattgelbe, etwas runzelige Haut, die mit Flüssigkeitstropfen besetzt ist. Nach 5 Tagen stehen noch immer auf der trockenen, sehr fein gerunzelten Hautschicht einzelne Tropfen.

6. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Nach 5 Tagen schwaches, bäumchenartiges Wachstum in den oberen Schichten. Wenig Hautbildung. Nach 14 Tagen kommt eine Trübung des Agar hinzu.

b) Gelatine: Äußerst schwaches Wachstum in nächster Nähe des Stichkanals.

7. Gelatineplatten: Nach 3 Tagen kaum wahrnehmbare, kleine Kolonien. Nach 5 Tagen wuchern auf der Oberfläche flechtenartige Riesenkolonien von

beträchtlicher Dicke und unregelmäßigem Umriß. Die Kolonien im Innern sind klein, rund und sehr kompakt. Nach 7 Tagen Verflüssigung.

Mikroskopisches Bild nach 5 Tagen: Die Oberflächenkolonien haben einen dunklen Kern, von dem aus dunkle und helle Streifen zum Rande verlaufen. Die Tiefenkolonien sind tiefbraun und setzen sich aus dunkleren und helleren Feldern zusammen. Vielleicht sind die dunkleren Stellen verursacht durch reichliche Ausbildung sekundärer Kolonien.

Wegen des so besonders charakteristischen Aussehens der Kolonien machte ich auch noch einen Versuch mit

8. Bouillonagarplatten: Die Tiefenkolonien sahen ähnlich aus wie in Gelatine, waren nur durchweg heller gefärbt. Die Oberflächenkolonien verzweigten und verästelten sich über die ganze Platte hinweg. Die Ausläufer selbst waren beinahe farblos. Am Ende jedes Zweiges bildete sich aber eine weißgelbe Tochterkolonie.

9. Kartoffeln: Überwiegend weiß und trocken; stellenweise aber schmierig gelb. Später außerdem rosa gefärbte, wulstige Wucherungen. Schließlich sitzt auf dem feuchten, schmutzig rosafarbenen Überzug ein trockener, gelber Schorf.

20.

Stäbchenform aus Boden No. 8.

1. Größe: 2—2,5 μ lang, 0,5 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Nach 6 Stunden bewegen sich zwischen den Sporen ziemlich kleine, schlanke Stäbchen mit scharfen Ecken. Nach 26 Stunden liegen in den jetzt unbeweglichen Stäbchen relativ sehr große Sporen, die die eine Hälfte ganz ausfüllen.

3. Bouillon: Nach 1 Tage ist die Flüssigkeit sehr trübe, die Haut locker. Nach 2 Tagen ist sie stumpf weiß geworden und sieht aus, als wenn sie mit Mehl bestäubt wäre.

4. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Die Haut hat leuchtend goldgelbe Farbe; Flüssigkeit und Bodensatz sind weiß.

5. Schrägagar:

a) Heyden: Nach 5 Tagen ganz schwaches Wachstum.

b) Bouillon: Nach 1 Tage ist die Oberfläche mattweiß, vollkommen glatt und trocken. Nach 2 Tagen fangen die Wucherungen aber am unteren Ende an, runzelig zu werden. Nach 5 Tagen sind sie vollständig mit äußerst kleinen, feinen Runzeln bedeckt.

6. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Nach 5 Tagen zeigt sich geringe, bäumchenartige Verzweigung. Die einzelnen Verästelungen sind schräg abwärts gerichtet. Nach 14 Tagen ist außerdem das ganze Substrat getrübt.

b) Gelatine: Nach 4 Tagen ziehen sich am Stichkanal entlang flache, zarte Schleier.

7. Gelatineplatten: Nach 3 Tagen erscheinen die ersten Kolonien. Nach 5 Tagen sind sie mittelgroß geworden; sie sind sämtlich kreisrund. Nach 7 Tagen beginnt die Verflüssigung.

Mikroskopisches Bild nach 5 Tagen: Um einen dunklen Kern legt sich ein heller Hof; beide sind scharf begrenzt und glänzen stark.

8. Kartoffeln: Anfänglich wechseln weißgraue und gelbe Partien miteinander ab. Die ersteren werden dann verdrängt. Endlich wird das Ganze von einer dunkelbraunen Glasur überzogen.

21.

Stäbchenform aus Boden No. 9.

1. Größe: 1,8—2,2 μ lang, 0,5 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Nach 6 Stunden ist der größte Teil der Sporen gekeimt. Die zarten, kleinen Einzelstäbchen bewegen sich lebhaft hin und her. Nach 26 Stunden fängt in manchen Stäbchen die Sporenbildung an. Die Bakterien sind dabei an einem Ende aufgetrieben. Allgemein wird die Sporenbildung aber erst nach 2 Tagen. Ketten kommen niemals vor. Die Sporen sind endständig, rund.

3. Bouillon: Nach 1 Tage Trübung. Nach 2 Tagen hat sich eine weiß punktierte Kahmhaut gebildet, von der Schleier in die jetzt noch stärker getrübte Flüssigkeit hinabhängen. Nach 4 Tagen ist der Schleier zu Boden gesunken.

4. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Wie Form 14; die Flüssigkeit ist jedoch fast klar.

5. Schrägagar:

a) Heyden: Nach 5 Tagen sind die mittleren Partien feucht glänzend, die äußeren trocken.

b) Bouillon: Nach 5 Tagen bildet sich ein graugelber Überzug, der in der Mitte feucht, außen trocken ist.

6. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Nach 5 Tagen reicht ein dünner Schleier kaum ½ cm tief hinab, nach 14 Tagen ist horizontale Verzweigung eingetreten, außerdem hat sich eine Haut gebildet.

b) Gelatine: Nach 4 Tagen sind ziemlich viele gelbliche Einzelkolonien gewachsen, die sich nach 7 Tagen zu einem zusammenhängenden Schleier vereinigt haben. Nach 8 Tagen Verflüssigung.

7. Gelatineplatten: Das Wachstum beginnt nach 3 Tagen. Verflüssigung tritt nach 7 Tagen ein.

Mikroskopisches Bild nach 5 Tagen: Die Kolonien sind groß und haben einen unregelmäßigen Rand.

8. Kartoffeln: Die anfänglich grauen, feuchten Wucherungen werden später dunkelbraun. Über sie hinweg lagert sich ein gelber, trockener Schorf.

22.

Stäbchenform aus Boden No. 10.

1. Größe: 2,2—2,6 μ lang, 0,4—0,6 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Nach 6 Stunden ist erst ein kleiner Teil der Sporen gekeimt. Die Stäbchen sind lang und dünn, aber immerhin etwas kräftiger als Form 17. Beweglichkeit fehlt. Nach 26 Stunden haben manche Stäbchen schon endständige, längliche Sporen gebildet. Alle Stäbchen liegen einzeln.

3. Bouillon: Nach 1 Tage schwimmen in der klaren Flüssigkeit einige Flocken. Der Kahm ist locker, wird aber nach 2 Tagen einheitlich und fest. Nach 3 Tagen wird die Flüssigkeit trübe.

4. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Die Haut ist kaum merklich gelb. Der Bodensatz weiß, die Flüssigkeit milchig.

5. Schrägagar:

a) Heyden: Am Strich entlang hängen nach einem Tage die Wucherungen zusammen. Hinzu kommen verstreute Einzelkolonien.

b) Bouillon: Nach 1 Tage trockene, mattweiße Wucherungen, die später runzelig werden.

6. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Nach 3 Tagen bilden sich bäumchenartige Verzweigungen, die 3 mm unter der Oberfläche ihre größte Breite haben.

b) Gelatine: Nach 5 Tagen liegen zahlreiche, verschwommene, große Kolonien dicht unter der Oberfläche und fangen schon an, die Gelatine zu verflüssigen.

7. Gelatineplatten: Nach 5 Tagen sind auf einer einzigen Platte 2 Kolonien gewachsen. Nach 7 Tagen sind auch auf anderen Platten einige hinzugekommen. Zugleich beginnt die Verflüssigung.

Mikroskopisches Bild nach 6 Tagen: Die Kolonien tragen um den dunklen Kern herum viele scharflinige Ausläufer.

8. Kartoffeln: Grauweißer, runzeliger, meist trockener Schorf.

23.

Stäbchenform aus Boden No. 12.

1. Größe: 1,2—1,5 μ lang, 0,4 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Nach 6 Stunden tanzen winzige Stäbchen lebhaft hin und her. Nach 26 Stunden finden sich außerdem kurze Ketten. Die Sporenbildung setzt erst nach 2 Tagen ein; beendigt ist sie nach 4 Tagen. Die Sporen sind endständig, etwas länglich.

3. Bouillon: Nach 1 Tage ist die Flüssigkeit sehr trübe; am Rande setzt sich etwas Haut ab. Die Trübung nimmt bis zum 4. Tage hin immer mehr zu; zu stärkerer Hautbildung kommt es jedoch nicht.

4. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Die Flüssigkeit ist stark getrübt; die Haut hat gelbe, der Bodensatz weiße Farbe.

5. Schrägagar:

a) Heyden: Nach 2 Tagen tritt zunächst nur lokales Wachstum auf. Es

bilden sich sehr zierliche, gefiederte, weiße Wucherungen, auch wohl Einzelkolonien. Nach 5 Tagen sind die scharfen Konturen verloren gegangen; die Oberfläche ist schmierig.

b) Bouillon: Nach 1 Tage ist die Oberfläche mattweis und etwas runzelig. Am oberen Ende haben sich isolierte Kolonien gebildet. Nach 5 Tagen ist das Ganze feucht geworden.

6. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Nach 5 Tagen bildet sich etwas Haut. Nach 14 Tagen ist der Agar trübe geworden.

b) Gelatine: Nach 4 Tagen reicht bis zur Mitte des Röhrchens ein zarter Schleier, unterhalb dessen sich nach 7 Tagen noch Einzelkolonien abgesondert haben. Eine Verflüssigung der Gelatine findet nicht statt.

7. Gelatineplatten: Nach 3 Tagen erscheinen viele kleine Kolonien von gelber Farbe, die stark glänzen. Nach 5 Tagen sind sie größer und dunkler geworden und haben jetzt einen kreisrunden Umriß. Die Gelatine bleibt dauernd fest.

8. Kartoffeln: Graue und gelbe sehr feuchte Oberflächenwucherungen. Ein eng begrenzter Teil wird rosa.

24.

Stäbchenform aus Boden No. 14.

1. Größe: 1,7—2 μ lang, 0,6—0,7 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Nach 6 Stunden ist die Sporenkeimung noch schwach. Die mittelgroßen Einzelstäbchen bewegen sich langsam vorwärts, ebenso die schon vorhandenen kurzen Ketten. Nach 26 Stunden ist das Bild ungeändert. Nach 2 Tagen werden endständig längliche Sporen gebildet.

3. Bouillon: Nach 1 Tage schwimmt auf der klaren Flüssigkeit eine gitterartige Kahmhaut. Nach 2 Tagen ist die Haut sehr fest geworden; die Verästelungen liegen dick auf. Nach 3 Tagen ist die Flüssigkeit trübe.

4. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Wie Form 12.

5. Schrägagar:

a) Heyden: Nach 5 Tagen dichte horizontale Verzweigungen.

b) Bouillon: Nach 1 Tage gleicht die Kultur der von Form 20. Sie bleibt aber dauernd glatt und sieht nach 5 Tagen aus, als ob zierliche, flache Eisblumen auf ihr lägen.

6. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Nach 5 Tagen bildet sich eine Haut; nach 14 Tagen kommt eine Trübung des Substrats hinzu.

b) Gelatine: Nach 7 Tagen zeigt sich soeben beginnendes Wachstum. Gleich darauf tritt schon Verflüssigung ein.

7. Gelatineplatten: Nach 3 Tagen erscheinen die ersten Spuren beginnenden Wachstums. Nach 5 Tagen sind die nicht zahlreichen Kolonien ziemlich groß geworden. Nach 7 Tagen ist die Platte verflüssigt.

Mikroskopisches Bild nach 5 Tagen: Um den mehr oder minder scharf abgesetzten, dunklen Kern lagert sich eine lockere, wollige Außenschicht, die manchmal wieder in 2 konzentrische Teile geschieden ist.

8. Kartoffeln: Ursprünglich graurosa und feucht; dann aber nach allmählichem Farbenwechsel schwarzbraun und gänzlich trocken.

25.

Stäbchenform aus Ackerland No. 15.

Obwohl dieses Bacterium aus demselben Boden stammt, wie die Formen 4, 5 und 6, ist eine Identifikation mit einer derselben nicht möglich.

1. Größe: 1,8—2,2 μ lang, 0,6 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Nach 6 Stunden ziemlich starke Keimung der Sporen, mittelgroße, bewegliche Stäbchen mit abgerundeten Ecken. Nach 26 Stunden haben sich im Endabschnitt der jetzt unbeweglichen Stäbchen ovale Sporen gebildet.

3. Bouillon: Nach 1 Tage ist die Flüssigkeit trübe. Nach 2 Tagen ist eine dicke, weiß bestäubte Haut entstanden. Dicht unter derselben ist die Bouillon klar, in tieferen Schichten trübe. Nach 4 Tagen ist die Trübung gänzlich verschwunden.

4. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Es bildet sich zwar keine Haut, aber ein dicker, weißer Bodensatz. Die Flüssigkeit ist trübe.

5. Schrägagar:

a) Heyden: Das Aussehen ist ähnlich Form 14, das Wachstum aber viel lebhafter.

b) Bouillon: Eine dünne, glatte, durchsichtige, schmierig glasierte Schicht bedeckt nach 1 Tage die ganze Oberfläche. Nach 2 Tagen ist die Farbe gelblich geworden.

6. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Nach 5 Tagen bildet sich ein zarter, verschwommener Schleier. Nach 14 Tagen zieht sich eine flockige Trübung durch die ganze Röhre, ohne Auszeichnung des Stichkanals.

b) Gelatine: Nach 4 Tagen ist ein zarter Schleier ohne erkennbare Einzelkolonien entstanden. Nach 7 Tagen heben sich einige Kolonien davon ab. Verflüssigung findet nicht statt.

7. Gelatineplatten: Nach 3 Tagen zeigen sich punktförmige Kolonien. Nach 5 Tagen sind sie kreisrund, gelb. Die Gelatine bleibt dauernd fest.

8. Kartoffeln: Anfangs gleichmäßig graugelb; später braungelb und schmierig.

26.

Stäbchenform aus Milch.

(Ausgangsmaterial No. 16.)

1. Größe: 2,7—3,2 μ lang, 0,7—0,9 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Nach 6 Stunden fängt die Keimung der Sporen an. Die sehr großen, kräftigen Stäbchen bewegen sich äußerst lebhaft. Ketten mit mehr als 4 Gliedern sind unbeweglich. Nach 26 Stunden sind auch die Einzelstäbchen fast unbeweglich geworden. Die ovalen Sporen bilden sich erst nach 4 Tagen ziemlich am Ende der Stäbchen.

3. Bouillon: Nach 1 Tage beginnt eine flockige Haut sich zu bilden. Nach 2 Tagen hat sie aufliegende Verästelungen bekommen. Die Flüssigkeit ist dauernd klar.

4. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Wie Form 12, aber nur schwach rosa.

5. Schrägagar:

a) Heyden: Nach 2 Tagen ist ein schwacher Strich erkennbar mit nervenartigen Verzweigungen, die allmählich stärker werden.

b) Bouillon: Wie Form 20.

6. Stichkulturen:

a) Heydenagar: Nach 5 Tagen hat sich ein wenig Haut gebildet. Nach 14 Tagen ist der Agar horizontal durch Seitenäste zerklüftet und außerdem getrübt.

b) Gelatine: Kein Wachstum.

7. Gelatineplatten: Nach 5 Tagen zeigt sich auf einer Platte eine einzige, tiefschwarze Kolonie mit hellem Rande, der in den folgenden Tagen sehr breit wird. Verflüssigung findet nicht statt. Möglicherweise hat es sich nur um eine Verunreinigung gehandelt, da ja in Gelatineröhrchen gar kein Wachstum erfolgt war.

8. Kartoffeln: Graurosa gefärbt; im höchsten Grade schmierig. Später legt sich über diese Wucherungen noch ein dicker, gelber Überzug.

27.

Stäbchenform aus Milch.

(Ausgangsmaterial No. 16.)

1. Größe: 1,7—2 μ lang, 0,6 μ breit.

2. Hängetropfenkultur: Erst nach 26 Stunden hat die Sporenkeimung soeben begonnen. Die mittelgroßen Stäbchen sind schwach beweglich. Auch kurze Ketten kommen vor. Nach 4 Tagen liegen im Endabschnitt der Stäbchen längliche Sporen.

3. Bouillon: Nach 1 Tage ist die Haut sehr zart und schleierartig. In der Flüssigkeit schwimmen Flocken; zum Teil haben sich diese aber auch schon abgesetzt. Bis zum 4. Tage hin nehmen Trübungen und Bodensatz stark zu. Die Haut behält dauernd ihr Aussehen.

4. Hefewasser mit 2 Proz. Zucker: Wie Form 12. Die rosa Färbung ist auch bei Flüssigkeit und Bodensatz außerordentlich kräftig.

5. Schrägagar:

a) Heyden: Nach 2 Tagen treten zahlreiche Einzelkolonien auf, die nach 5 Tagen auch in tiefere Schichten vorgedrungen sind, aber inzwischen verschwommene Umrisse bekommen haben.

b) Bouillon: Nach 1 Tage gleichmäßige, dünne, weiße Wucherungen, die später schmierig zerfließen.

6. Stichkulturen:
a) Heydenagar: Nach 5 Tagen etwas Haut, nach 14 Tagen wie Form 26.
b) Gelatine: Nach 7 Tagen zeigen sich Spuren von Haut. Verflüssigung erfolgt nicht.
7. Gelatineplatten: Nach 7 Tagen erscheinen massenhaft winzige Kolonien. Die Gelatine bleibt dauernd fest.
Mikroskopisches Bild nach 9 Tagen: Von einem sehr kleinen, dunklen Kern strahlen zahlreiche, fädige Ausläufer aus.
8. Kartoffeln: Das ganze Kartoffelstück verfärbt sich graugelb, ohne daß zunächst Auflagerungen entstehen. Später bildet sich ein erst trockener, dann feuchter, weißlicher Schorf.

28.
Stäbchenform aus Milch.
(Ausgangsmaterial No. 16.)

Dieses Bacterium hat große Ähnlichkeit mit dem vorigen. In Hängetropfenkulturen gleichen sich beide vollkommen.
Unterschiede:
1. In Bouillon wird die Haut fettartig und nimmt schließlich eine gelbbraune Farbe an.
2. Auf einer von 3 Gelatineplatten wächst eine einzige, sehr große, dunkle Kolonie mit doppeltem, hellem Hof, während in Gelatinestichkulturen keine Unterschiede gegenüber No. 27 bestanden.
3. Auf Kartoffeln bildet sich ein trockener, graurosa gefärbter Schorf.

Nicht erwähnt habe ich in den vorliegenden Ausführungen die Kulturen, die ich zur Prüfung auf Indolbildung in Hefewasser und diejenigen, die ich in Milch ansetzte. Sämtliche Bakterien koagulierten Milch; bei keinem einzigen ließ sich Entstehung von Indol nachweisen. Da beide Untersuchungen also zur Unterscheidung der Arten nicht zu verwenden waren, glaubte ich, sie mit einmaliger Erwähnung an dieser Stelle erledigen zu können. — Der Nachweis von Indol geschieht durch Zusatz von salpetriger Säure, mit der es einen rosa Farbstoff bildet. In dieser Weise nahm ich die Prüfung vor. In neuerer Zeit hat man festgestellt (1), daß diese Methode nicht ganz zuverlässig ist, weil salpetrige Säure auch mit einigen anderen organischen Stoffen eine rosa Färbung gibt. Man läßt deshalb auch wohl Dimethylamidobenzaldehyd auf die Kulturen einwirken, das mit Indol einen roten Farbstoff bildet. Da ja aber bei meinen Untersuchungen schon mit salpetriger Säure nirgends eine Färbung eintrat, war wohl ein Irrtum ausgeschlossen. Ich glaubte deshalb, auf den zweiten Versuch verzichten zu können.

Nunmehr möchte ich noch einige Untersuchungen zusammenstellen, die sich für eine tabellarische Übersicht eignen, und für die ich deshalb diese Art der Darstellung gewählt habe.

(Siehe Tabelle I.)

Die Prüfung auf Säurefestigkeit geschah derart, daß die Bakterien zunächst in üblicher Weise kräftig mit Methylenblau durchgefärbt wurden. Dann wurde ein Tropfen verdünnter Schwefelsäure zugesetzt und nach wenigen Sekunden abgespült. Hatten die Stäbchen dann die Farbe gehalten, so wurden sie als säurefest bezeichnet, was ich in der Tabelle durch das +-Zeichen andeutete.

Bei der Gramschen Färbung behandelte ich die Bakterien nacheinander mit Anilinwassermethylviolett und mit Jod. Behielten sie dann bei der Einwirkung von absolutem Alkohol, die wieder einige Sekunden währte, die Farbe, so galten sie als gram-positiv (+).

Tabelle I.

	Art des Versuchs	Nummer der Bakterienform													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1.	Prüfung auf Säurefestigkeit . .	+	+	+	+	—	+	—	—	+	+	+	—	+	+
2.	Gramsche Färbung.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3.	Zunahme der Alkalität in Hefewasser in % nach 14 Tg.	55,3	34,2	47,4	63,2	42,1	36,8	47,2	60,5	57,9	71,1	48,0	47,6	44,7	42,5
4.	Desgleichen in Hefewasser mit 2 % Harnstoff.	93,3	34,9	67,4	63,3	140	100	133,3	60,7	60	146,7	100	47,6	44,9	42,8
5.	Zuckergehalt in % nach 3 Wochen, bei anfangs 2 %	0	0	0,83	0,19	0,17	0	0,08	0	0,07	0,20	0	0,21	0,60	0,15

	Art des Versuchs	Nummer der Bakterienform													
		15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1.	Prüfung auf Säurefestigkeit . .	—	—	+	+	—	+	—	—	+	—	—	+	+	—
2.	Gramsche Färbung.	+	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+
3.	Zunahme der Alkalität in Hefewasser in % nach 14 Tg. . .	45,4	46,8	39,6	57,1	60,2	43,4	54,8	67,2	48,3	38,4	54,4	71,5	55,3	53,5
4.	Desgleichen in Hefewasser mit 2 % Harnstoff.	45,4	47	39,5	57,4	81,6	43,2	75,3	67,2	69,3	43,1	55	71,7	82	74,2
5.	Zuckergehalt in % nach 3 Wochen, bei anfangs 2 %	0,18	0,21	0,22	0,20	0,13	0,10	0,16	0,20	0,22	0,21	0,19	0,18	0,16	0,18

Zur Feststellung der durch Harnstoff allein bedingten Alkalitätszunahme wolle man die Differenz der Horizontalreihen 4 und 3 bilden.

Die Zunahme der Alkalität untersuchte ich zunächst im Bouillon-, bzw. Hefewasser. In je 10 ccm Bouillon, deren Alkalität ich durch Titration festgestellt hatte, wurde eine Platinöse voll Bakteriensporen eingeimpft. Nach 14 Tagen wurde von neuem titriert. Zur Titration benutzte ich $^1/_{10}$ n Schwefelsäure, als Indikator Methylorange. Die Zunahme wurde angegeben in Prozenten, gemessen am ursprünglichen Alkaligehalt. Durch die in gleicher Weise vorgenommene Prüfung der Alkalitätszunahme in harnstoffhaltigen Nährböden konnte ich feststellen, ob und in welchem Maße Harnstoff von den einzelnen Bakterienarten abgebaut wurde. Es handelt sich dabei nämlich um einen hydrolytischen Vorgang, eine Umwandlung von Harnstoff in kohlensaures Ammoniak. Das letztere läßt sich natürlich durch Prüfung der Alkalitätszunahme, verglichen mit der Alkalitätszunahme in reinem Hefewasser, nachweisen.

Der quantitativen Untersuchung der Zuckerzersetzung ging eine qualitative voraus. Beim Zuckerabbau bilden die Bakterien organische Säuren. Ich setzte deshalb der Nährlösung von Hefewasser mit 2 Proz. Zucker etwas Lakmus zu und impfte dann. In allen Fällen trat im Verlauf einer Woche der Farbenumschlag von blau nach rot ein. Es waren also Säuren entstanden, somit Abbau des Zuckers wahrscheinlich, da ja in zuckerfreien Nährlösungen stets eine Zunahme der Alkalität festzustellen gewesen war.

Darauf setzte ich noch einmal dieselbe Versuchsreihe an, jedoch ohne Lakmus. Dagegen fügte ich Calciumkarbonat hinzu, um die entstehenden Säuren zu binden, damit das Bakterienwachstum nicht durch sie gehindert würde. Der Versuch wurde nach 3 Wochen abgebrochen. Zur quantitativen Bestimmung des noch vorhandenen Zuckers benutzte ich die Reduktion bekannter Mengen von erwärmter Fehling scher Lösung nach vorangehender Fällung anderer organischer Substanzen mit Bleiessig. Vielleicht gewinnt die Darstellung an Übersichtlichkeit, wenn ich zum Schluß dieses Teiles auch einige der schon erwähnten Ergebnisse tabellarisch zusammenstelle.

Über Sporenkeimungs- und Bildungszeit bei Zimmertemperatur finden sich Angaben im Text auf p. 25.

(Siehe Tabelle II.)

Auf Grund der gewonnenen Daten verglich ich die von mir isolierten Bakterien mit bekannten Formen. In der von mir zitierten Literatur finden sich eingehende Bakterienbeschreibungen nur bei Globig (8), Blau (2) und Christen. Eine Identifikation meiner Formen mit irgendwelchen der dort erwähnten war jedoch nicht möglich.

Hinsichtlich der von mir benutzten Werke über Systematik der Bakterien vergl. p. 38 (4), (7), (12).

Hervorheben möchte ich, daß mir Formen des Subtilis-Kreises nicht begegneten. Die jenen eigentümliche Keimung mit Kappen fand ich in keinem einzigen Falle. Hingegen möchte ich mehrere meiner Bakterien, trotz einzelner Unterschiede, in den Verwandtschaftskreis dreier anderer bekannter Bakterien einordnen.

Es reihen sich:

An Bac. mycoides Flügge, No. 1—4,
An Bac. mesentericus ruber Globig, No. 9, No. 18,
An Bac. mesentericus, Flügge, No. 24.

Tabelle II.

	Art des Versuchs	Nummer der Bakterienform						
		1	2	3	4	5	6	7
1.	Gelatineverflüssigung (Platten)	8. Tag	12. Tag	Wie 1	6. Tag	11. Tag	9. Tag	12. Tag
2.	Wachstum auf Kartoffeln	Rosa-gelb, schmierig	Wie 1	Wie 1	Wie 1	Gelbrot, trocken	Lokale, dunkelrote Wucherung	Rotgelb, schmierig
3.	Sporenkeimungszeit bei Zimmertemperatur	1.—5. Tag	1.—4. Tag	1.—5. Tag	5.—7. Tag	1.—4. Tag	5.—8. Tag	5.—7. Tag
4.	Sporenbildungszeit bei Zimmertemperatur	Vom 6. Tag	Vom 4. Tag	Vom 6. Tag	Vom 7. Tag	Vom 4. Tag	Vom 8. Tag	Vom 7. Tag

	Art des Versuchs	Nummer der Bakterienform						
		8	9	10	11	12	13	14
1.	Gelatineverflüssigung (Platten)	4. Tag	8. Tag	9. Tag	13. Tag	6. Tag	10. Tag	11. Tag
2.	Wachstum auf Kartoffeln	Wie 7	Wie 7	Grau, dick, weich	Weiß, trocken, schwach	Dunkelbraun, trocken	Wie 12	Braungelb, trocken
3.	Sporenkeimungszeit bei Zimmertemperatur	1.—5. Tag	1.—5. Tag	1.—4. Tag	5.—8. Tag	1.—5. Tag	5.—7. Tag	4.—4. Tag
4.	Sporenbildungszeit bei Zimmertemperatur	Vom 6. Tag	Vom 6. Tag	Vom 4. Tag	Vom 8. Tag	Vom 6. Tag	Vom 7. Tag	Vom 4. Tag

Tabelle II (Fortsetzung).

	Art des Versuchs	Nummer der Bakterienform						
		15	16	17	18	19	20	21
1.	Gelatineverflüssigung (Platten)	—	—	10. Tag	10. Tag	7. Tag	7. Tag	8. Tag
2.	Wachstum auf Kartoffeln	Braun	Goldgelb, dann gelbbraun	Weiß, dann grau	Schmutzig rotgelb	Schmutzig rosa	Dunkel-braun	Wie 20
3.	Sporenkeimungszeit bei Zimmertemperatur	5.—7. Tag	1.—5. Tag	5.—8. Tag	1.—4. Tag	5.—7. Tag	1.—5. Tag	5.—8. Tag
4.	Sporenbildungszeit bei Zimmertemperatur	Vom 7. Tag	Vom 6. Tag	Vom 8. Tag	Vom 4. Tag	Vom 7. Tag	Vom 6. Tag	Vom 8. Tag

	Art des Versuchs	Nummer der Bakterienform						
		22	23	24	25	26	27	28
1.	Gelatineverflüssigung (Platten)	7. Tag	—	7. Tag	—	—	—	—
2.	Wachstum auf Kartoffeln	Grauweiß, runzelig	Grau-gelb, sehr feucht	Schwarz-braun	Braungelb, schmierig	Grau-rosa, sehr schmierig	Grau-gelb, mit weißem Schorf	Grau-rosa, trocken
3.	Sporenkeimungszeit bei Zimmertemperatur	5.—7. Tag	5.—7. Tag	5.—7. Tag	1.—4. Tag	1.—4. Tag	5.—8. Tag	5.—8. Tag
4.	Sporenbildungszeit bei Zimmertemperatur	Vom 7. Tag	Vom 7. Tag	Vom 7. Tag	Vom 4. Tag	Vom 4. Tag	Vom 8. Tag	Vom 8. Tag

Untersuchungen über die Gründe der Resistenz der besprochenen Bakterien.

Wie ich schon in der Einleitung sagte, war meine erste Aufgabe, die Ursache zu finden, warum die von mir untersuchten Bakterienformen bei fraktionierter Sterilisation am Leben bleiben. Ich vermutete, daß bei den Bakterien, die der fraktionierten Sterilisation widerstehen, die Keimung vielleicht noch später, als nach 2 Tagen erfolgen möchte. In diesem Falle müßten nach der dritten Sterilisation noch lebensfähige Sporen vorhanden sein, die später auskeimen könnten. Dann mußte es bei geeigneter Veränderung des Sterilisationsintervalls oder mehr als dreimaliger Sterilisation aber möglich sein, auch bei diesen Formen eine vollständige Abtötung zu erzielen.

Um in der Keimungsfrage klar zu sehen, machte ich mehrere Versuche.

I. Zunächst setzte ich von meinen Bakterien wieder Hängetropfenkulturen an, bewahrte sie aber nicht im Brutzimmer, sondern bei gewöhnlicher Zimmertemperatur auf. Das geschah, weil ich ja Einblick in den Gang der Keimung zwischen 2 Sterilisationen gewinnen wollte; bei der üblichen fraktionierten Sterilisation findet dann aber auch die Aufbewahrung bei Zimmertemperatur statt. Dabei bekam ich folgende Ergebnisse:

Bakterienform No. 14.

Nach 24 Stunden sind erst sehr wenige Sporen gekeimt. Nach 48 Stunden hat die Zahl der Sporen abgenommen, ist jedoch noch immer sehr groß. Nach 3 Tagen ist noch immer eine ziemlich große Zahl ungekeimter Sporen vorhanden. Nach 4 Tagen ist ziemlich alles gekeimt. Nach einigen weiteren Stunden zeigen sich in manchen Stäbchen schon wieder Sporen. Nach 5 Tagen ist die Sporenbildung ziemlich weit verbreitet.

No. 15.

Nach 3 Tagen sind noch fast alle Sporen ungekeimt. Nach 5 Tagen ist noch etwa die Hälfte der Sporen vorhanden. Nach 7 Tagen sind noch immer einige Sporen vorhanden; in einzelnen Stäbchen bilden sich schon wieder neue Sporen.

No. 16.

Nach 1 Tage ist die Keimung schon weit fortgeschritten. Nach 3 Tagen ist noch immer reichlich die Hälfte der Sporen ungekeimt. Nach 5 Tagen ein dichtes Gewirr von Stäbchen und Sporen. Nach 6 Tagen keine alten Sporen mehr, aber in einem Teil der Stäbchen schon wieder neue Sporen.

No. 17.

Nach 5 Tagen zeigen sich die ersten Anfänge der Keimung, die nach 8 Tagen noch nicht beendigt ist, als sich in manchen Stäbchen schon wieder Sporen bilden.

Die übrigen untersuchten Bakterien verhielten sich im ganzen ähnlich wie eine dieser 4 Formen, und zwar ließen sich anschließen:

An No. 14: No. 2, 5, 10, 18, 25 u. 26.
An No. 15: No. 4, 7, 13, 19, 22, 23 u. 24.
An No. 16: No. 1, 3, 8, 9, 12, 20.
An No. 17: No. 6, 11, 21, 27 u. 28.

Die Keimung tritt also entweder überhaupt sehr spät ein, oder aber sie verteilt sich über einen Zeitraum, der länger ist, als die bei der fraktionierten Sterilisation üblichen 2 Tage. Zu beachten ist, daß bei den Typen No. 15 und No. 17 das Ende der Keimung und der Beginn der neuen Sporenbildung zusammenfallen; denn dadurch kann unter Umständen eine Sterilisation zur Unmöglichkeit werden.

II. Der Versuch hatte den Nachteil, daß ich stets auf Schätzungen angewiesen war, was die Menge der gekeimten oder nichtgekeimten Sporen anbetraf.

Dem suchte ich, in einer zweiten Versuchsreihe aus dem Wege zu gehen und die jeweils noch ungekeimten Sporen direkt zu zählen. In die Höhlung ausgeschliffener Objektträger brachte ich Sporen in Gelatine, um sie an einem Punkte festzuhalten. Zugleich wurde dabei die störende Brownsche Molekularbewegung ausgeschaltet. Diese Präparate beobachtete ich dann unter einem Mikroskop mit Kreuztisch, sodaß eine exakte Einstellung bestimmter Sporen und eine genaue Durchforschung des Gesichtsfeldes möglich war. Die Untersuchung erfolgte wieder bei Zimmertemperatur aus den schon oben angegebenen Gründen.

No. 6.

Zu Beginn des Versuchs zählte ich 127 Sporen.
Nach 1 Tage waren 5 Sporen gekeimt; nach 2 Tagen 13 und nach 3 Tagen 17. Ein großer Teil der übrigen sah geschwollen aus. Nach 4 Tagen fand ich 37 Stäbchen, nach 5 Tagen 61. Nach 6 Tagen waren 79 Sporen gekeimt; in 4 Stäbchen lagen neue Sporen. Nach 7 Tagen waren 85 Sporen gekeimt; 12 Stäbchen trugen neue Sporen. Nach 8 Tagen waren 87 Sporen gekeimt. Die übrigen keimten überhaupt nicht. Die Bildung der neuen Sporen war nach 11 Tagen beendigt.

No. 8.

Zu Anfang zählte ich 78 Sporen. Nach 4 Tagen keimten 2 Sporen. Nach 5 Tagen waren 7, nach 6 Tagen 25 Sporen gekeimt. Die übrigen keimten nicht, auch wurden keine neuen Sporen gebildet.

No. 9.

Die Keimung begann nach 2 Tagen. Von den anfangs vorhandenen 167 Sporen keimten aber im Verlauf von 6 Tagen nur 33. Auch blieb die Bildung neuer Sporen aus und die Vermehrung durch Teilung wurde bald eingestellt, so daß durch diesen Verlauf kaum die wirklichen Verhältnisse in Flüssigkeit gespiegelt sein dürften.

No. 12.

Nach 1 Tage waren von den 106 Sporen 12 gekeimt. 2 Stäbchen hatten sich schon geteilt. Nach 2 Tagen waren 57 Sporen gekeimt, nach 3 Tagen 86, nach 4 Tagen 95, nach 5 Tagen 99, nach 6 Tagen 102. Die übrigen 4 keimten nicht. Die Bildung der neuen Sporen begann nach 7 Tagen.

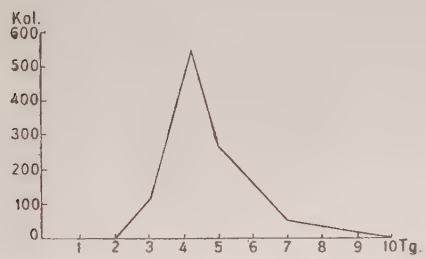
Bei dieser Versuchsreihe ist jedenfalls die schon erwähnte entwicklungshemmende Wirkung der Gelatine sehr in Betracht zu ziehen, die wohl noch verstärkt sein mag durch den starken Sauerstoffmangel, der durch die ganze Versuchsanordnung bedingt war. Ein Ersatz der Gelatine durch Agar war nicht angängig, weil er zu ungleichmäßig geliert, als daß eine Beobachtung in Agar bei starker Vergrößerung möglich wäre.

III. Gute Ergebnisse bekam ich dagegen mit Agar bei einem anderen Versuch, der auf die gleiche Frage Bezug hatte. Je 10 ccm Bouillonagar, den ich mit einer Platinöse voll Sporen beimpft hatte, brachte ich in Petrischalen, und zwar bewahrte ich sie bei Zimmertemperatur, auf der Deckelschale stehend, auf. So war es leicht, in den Agarplatten das Kolonienwachstum zu kontrollieren. Agar benutzte ich bei diesem Versuche, um der Verflüssigung der Gelatine durch viele Bakterien aus dem Wege zu gehen. Ich verfolgte den Verlauf der Keimung bei Zimmertemperatur 11 Tage lang. Jede Kolonie wurde bei ihrem Entstehen mit einem Tintenpunkt versehen, sodaß eine doppelte Zählung ausgeschlossen war. Von der Zahl der auftauchenden Kolonien war ein direkter Rückschluß auf den Verlauf der Keimung möglich; ich greife wohl nicht fehl, wenn ich die Keimung selbst etwa 1 Tag vor dem makroskopischen Sichtbarwerden der Kolonie ansetze. Über den Gang der

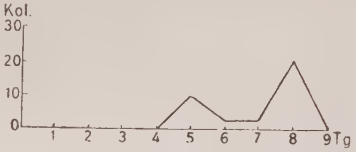
Keimung geben die Kurven 1—4 Aufschluß. Auf der Abszisse ist die Zeit, auf der Ordinate der Zuwachs an Kolonien aufgetragen.

Da das Wachstum bei den einzelnen Formen sehr verschieden stark war, konnte ich nicht überall den gleichen Maßstab wählen. Jedenfalls zeigen die Kurven auf das Deutlichste, daß die Keimung einerseits viel später eintritt und sich über einen längeren Zeitraum erstreckt, als bei sonstigen Bakterien, daß sie andererseits auch bei den von mir untersuchten Formen durchaus nicht einheitlich verläuft, liegen doch die Keimungsmaxima bei den beliebig herausgegriffenen 4 Arten, einmal am 4., einmal am 5. und 8., einmal am 7. und einmal am 8. Tage. Und in diesen Ergebnissen besteht ja auch Übereinstimmung zwischen allen 3 Versuchsreihen.

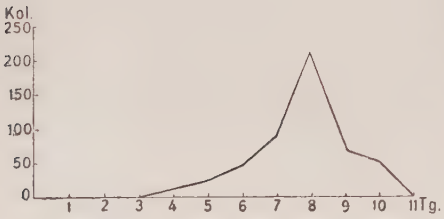
Kolonienwachstum im Verlauf von 11 Tagen.



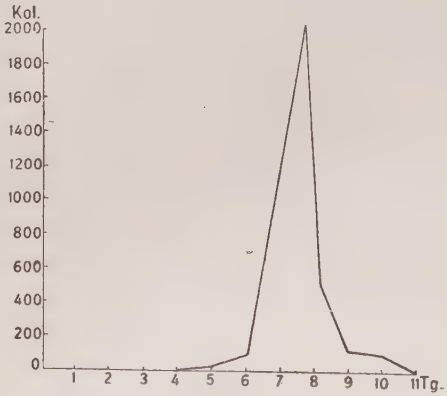
Kurve 1. Bacterium No. 1.
Maßstab 1 : 100.



Kurve 2. Bacterium No. 10.
Maßstab 1 : 10.



Kurve 3. Bacterium No. 19.
Maßstab 1 : 50.



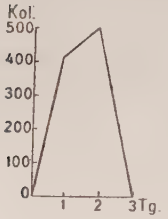
Kurve 4. Bacterium No. 26.
Maßstab 1 : 200.

Um genauer festzustellen, daß hier tatsächlich wesentliche Unterschiede gegenüber leichter fraktioniert sterilisierbaren Formen vorliegen, setzte ich mit derartigen Bakterien Kontrollversuche an. Von vornherein sah ich von solchen ab, deren Sporen schon bei einmaligem Sterilisieren bei 100° getötet werden; denn in diesem Falle spielt ja die frühere oder spätere Keimung keine Rolle. Geeignet waren dagegen solche, die nach einmaliger Sterilisation bei 100° noch Wachstum zeigten, nach dreimaliger aber getötet waren.

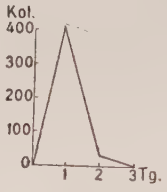
Derartige Bakterien isolierte ich aus Ackererde. Die Erdproben erhitzte ich in Hefewasser 20 Min. lang auf 100° und schied dadurch sofort diejenigen Formen aus, die dieser Temperatur nicht standhalten. Die weiter wachsenden Formen zog ich in Reinkulturen und wählte dann nach wiederholten Versuchen diejenigen aus, die der fraktionierten Sterilisation nicht widerstanden. Es waren das 2 Stäbchenformen. War meine Annahme richtig, so mußte die Keimung innerhalb der ersten 3 Tage beendigt werden. Die Versuchsanordnung

war dieselbe, wie bei Versuch III mit den schwer sterilisierbaren Bakterien. Das Ergebnis veranschaulichen die Kurven 5 und 6.

Die Keimungsmaxima lagen diesmal also am 2., bezw. schon am 1. Tage, d. h. viel früher als bei den schwer sterilisierbaren Formen. Beendigt war die Keimung bei 5 und 6 schon am 3. Tage. Das Ergebnis entsprach also vollkommen meinen Erwartungen. Demnach darf ich wohl als erwiesen ansehen, daß die Schwersterilisierbarkeit eine Folge verzögerter Keimung ist. Natürlich wäre an anderer Stelle (vgl. p. 34 ff.) noch auf die Tatsache einzugehen, daß die schleppende Keimung durch geringe Durchlässigkeit der Sporenmembran für Wasser usw. verursacht wird.



Kurve 5.
Leichtsterilisierbare Form.
Maßstab 1 : 100.



Kurve 6.
Leichtsterilisierbare Form.
Maßstab 1 : 100.

Nachdem meine Voraussetzungen sich so als richtig erwiesen hatten und ein Einblick in die Gründe für die Schwersterilisierbarkeit der betreffenden Bakterien gewonnen war, durfte ich wohl vermuten, daß es tatsächlich möglich sein würde, die fraktionierte Sterilisation so abzuändern, daß auch diese Bakterien getötet würden.

Ich ging also zunächst daran, die fraktionierte Sterilisation zu variieren, um festzustellen, ob unter geeigneten Bedingungen die Bakterien doch bei 100° abzutöten wären. Dabei gab es wieder 3 Möglichkeiten:

Ich konnte erstens den Zeitraum zwischen den Sterilisationen unverändert lassen, also täglich sterilisieren, dafür aber die Temperatur des Aufbewahrungsortes erhöhen, denn in diesem Falle mußte nach den Ergebnissen meiner Hängetropfenkulturen die Keimung schneller eintreten. Oder aber ich konnte zweitens die Kulturen wie bisher in der Zwischenzeit bei Zimmertemperatur aufbewahren, dafür aber diese Zwischenzeit verlängern. Endlich konnte ich drittens das Intervall von 24 Stunden und auch die Aufbewahrung bei Zimmertemperatur festhalten, dafür aber die Zahl der Sterilisationen erhöhen. Alle 3 Versuche führte ich durch. Stets impfte ich Reagenzgläser, die 10 ccm Bouillon, bezw. Hefewasser enthielten, mit einer Platinöse voll Sporenmaterial, so daß in dieser Hinsicht möglichste Einheitlichkeit herrschte.

I. Röhren, die mit den Bakterien No. 1—13 beimpft waren, wurden an 3 aufeinanderfolgenden Tagen sterilisiert und in der Zwischenzeit bei 30° im Brutzimmer zur Beschleunigung der Keimung aufbewahrt. Die Röhrchen wurden nicht steril. Wie das nach meinen Resultaten mit Hängetropfenkulturen wohl zu erwarten war, mußten einzelne Stäbchen in den dazwischen liegenden 24 Stunden schon wieder Sporen gebildet haben, oder aber ein Teil der Sporen war erst nach mehr als 3 Tagen gekeimt. Daß jedenfalls der erste dieser Gründe mitbeteiligt war, geht daraus hervor, daß auch nach 4 und 5 maliger Sterilisation unter den gleichen Bedingungen es nicht gelang, die Bakterien abzutöten. Die Zeit der Sporenbildung ist aus der systematischen Übersicht zu entnehmen.

Daß manche Bakterien ihren Entwicklungsgang in 24 Stunden beendigt hatten, ist um so mehr anzunehmen, als ja ein kurzes Aufkochen der Sporen die Keimung und damit den Ablauf der ganzen Entwicklung beschleunigen soll. Wenn das stimmt, muß natürlich eine Sterilisation bei 100° ebenso wirken.

Um in diesem Punkte ganz sicher zu gehen, kochte ich Sporen 5 Min. lang, beimpfte mit ihnen Agarplatten und setzte außerdem gleich stark geimpfte Parallelversuche mit ungekochtem Material an. In allen Fällen hatte ich nach 24 Stunden auf den Platten mit gekochten Sporen etwa doppelt so starkes Kolonienwachstum, als auf den anderen. Nach einigen Tagen glichen sich die Unterschiede aus. Danach konnte ich die obige Annahme wohl als bewiesen ansehen.

II. Da also Erhöhung der Aufbewahrungstemperatur nicht zum Ziele führte, begann ich jetzt mit Versuchen mit mehrtägigem Sterilisationsintervall und Aufbewahrung bei Zimmertemperatur. Dabei erzielte ich zum Teil gute Resultate. Zunächst arbeitete ich wieder mit den Bakterien No. 1—13. Bei einem Zwischenraum von 2 Tagen und dreimaliger Sterilisation blieben steril die Formen No. 2, 5, 9, 10 und 13; bei dreitägigem die Formen No. 7, 9, 11 und 13. Daß die Formen 2, 5 und 10 im zweiten Falle schon wieder unsteril wurden, ist wohl darauf zurückzuführen, daß ihnen ein Zeitraum von 3 Tagen schon genügte, um neue Sporen zu bilden. Allerdings hatte ich bei den Untersuchungen im Hängetropfen (vergl. p. 25) bei diesen 3 Formen erst am 4. Tage Sporenbildung feststellen können. Berücksichtigt man aber die oben erwähnte Beschleunigung der Keimung durch Erhitzen, so darf man in dem Zeitraum zwischen den Sterilisationen auch auf schnellere Keimung und damit schnellere Sporenbildung rechnen. Nach den Angaben auf p. 25 trat die Keimung in größerem Maßstabe nämlich erst am 2. Tage ein. Nehmen wir nun an, daß sie nach dem Erhitzen während der Sterilisation schon am 1. Tage erfolgte, so mußte auch der ganze Entwicklungsablauf 1 Tag früher, die Sporenbildung also in 3 Tagen beendigt werden.

Gelang es bei einer Bakterienart nicht, sie mit einem der angegegeben Intervalle abzutöten, so war es nach dieser Methode überhaupt nicht mehr möglich. Lagen noch mehr Tage zwischen den Sterilisationen, wie das ja bei Formen nötig war, die am 7. Tage noch nicht die Keimung beendigt hatten, so genügte die Zeit zwischen je zwei Sterilisationen auch bei Zimmertemperatur zur Bildung einer kräftigen Kahmhaut und auch wohl zur Beendigung des gesamten Entwicklungsganges bei den erst gekeimten Stäbchen, so daß damit schon wieder neues Sporenmaterial gegeben war.

Später machte icht noch einmal denselben Versuch mit den Formen No. 14, 15, 17, 18, 21 und 22. Um die Abnahme der Sporen und damit die Keimung verfolgen zu können, impfte ich nach jeder 2. und 3. Sterilisation eine Platinöse voll Flüssigkeit aus den einzelnen Röhrchen in Agarplatten, auf denen ich dann die Zunahme der Kolonienzahl beobachtete. Daß sie nicht so stark sein konnte, wie in den sterilisierten Röhrchen, liegt auf der Hand, denn auf den Platten arbeitete ich ja mit einer viel stärkeren Verdünnung. Dadurch bestand die Gefahr, daß auf den Plattenkulturen, die ich nach den Schlußsterilisationen anfertigte, unter Umständen gar kein Wachstum mehr eintrat, selbst wenn noch nicht alle Sporen abgetötet waren. Es bestand dann ja die Möglichkeit, daß von den vermutlich nur wenigen Sporen, die noch keimfähig waren, einmal in eine Platinöse voll Flüssigkeit keine mehr hineingelangte. Zur Kontrolle hatte ich dann ja aber stets die Originalröhrchen, in denen ich gleichfalls das Wachstum beobachtete. Daß diese Vorsicht nicht unnötig war, ist daraus ersichtlich, daß tatsächlich zwar nicht bei diesem, aber bei einem anderen, auf p. 31 erwähnten Versuche in einigen Fällen die Platten steril blieben, während in den Röhren mit unverdünntem Material noch Wachstum eintrat. Bei dem vorliegenden Versuche stimmten

die Ergebnisse in den Reagenzrohr- und den Plattenkulturen jedoch überein; d. h. nach 2 maliger Sterilisation trat bei allen gewählten Intervallen noch Wachstum ein, nach 3 maliger blieb es bei 2 tägigem Intervall aus bei No. 14 und 18, bei 3 tägigem bei No. 14.

Die Resultate der Plattenzählungen habe ich in den nachfolgenden Tabellen zusammengestellt.

Tabelle III, 1—5.

1. Kolonienzahl auf Platten, die mit Material aus zweimal mit zweitägigem Intervall sterilisierten Röhrchen beimpft wurden.

Nummer der Bakterien	Beobachtungstage								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
14	—	4	11	15	2	2	—	1	—
15	—	—	—	4	1	—	—	—	—
17	—	—	11	5	3	2	—	—	—
18	—	4	4	15	13	5	3	2	1
21	—	1	2	—	2	15	17	5	1
22	—	6	2	2	—	—	—	—	—

2. Beimpft aus dreimal mit zweitägigem Intervall sterilisierten Röhrchen.

Nummer der Bakterien	Beobachtungstage								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
14	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15	—	—	—	—	1	—	—	—	—
17	—	—	3	1	1	—	—	—	—
18	—	—	—	—	—	—	—	—	—
21	—	—	—	1	—	—	—	—	—
22	—	—	1	—	—	3	1	—	—

3. Beimpft aus zweimal mit dreitägigem Intervall sterilisierten Röhrchen.

Nummer der Bakterien	Beobachtungstage								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
14	—	2	—	—	—	1	—	—	—
15	—	—	337	24	6	1	—	—	—
17	—	15	1	—	2	1	—	—	—
18	—	—	4	—	—	—	—	—	—
21	—	2	—	17	10	4	—	—	—
22	—	7	2	1	1	1	—	—	—

4. Beimpft aus dreimal mit dreitägigem Intervall sterilisierten Röhrchen.

Nummer der Bakterien	Beobachtungstage								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
14	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15	—	5	—	—	5	1	—	—	—
17	—	3	4	—	1	—	—	—	—
18	—	—	—	—	1	1	—	—	—
21	1	4	—	4	2	2	—	—	—
22	2	—	—	2	—	1	—	—	—

5. Gesamtwachstum bei den obigen vier Versuchsreihen.

Nummer der Bakterien	Versuchsreihen			
	Zweitägiges Intervall		Dreitägiges Intervall	
	zweimal	dreimal	zweimal	dreimal
14	35	—	3	—
15	5	1	368	11
17	21	5	19	8
18	47	—	4	2
21	43	1	33	13
22	10	5	12	5

III. Bei den bisher erwähnten Versuchsreihen hatte ich an der Dreizahl der Sterilisation festgehalten. Wie aus allen Tabellen hervorgeht, steht die Zahl der am Leben gebliebenen Sporen im umgekehrten Verhältnis zu der Zahl der Sterilisationen. Bei manchen Formen war schon nach 3 maliger Sterilisation vollständige Abtötung erfolgt, bei denen nach 2 maliger Sterilisation noch Wachstum eingetreten war. Die Vermutung lag also nahe, daß sich bei allen Formen das Wachstum würde vollständig vernichten lassen, wenn nur die Zahl der Sterilisationen groß genug gemacht würde.

Die einfachste mögliche Versuchsanordnung war dabei die, daß ich im übrigen an den Bedingungen der üblichen fraktionierten Sterilisation festhielt, daß ich also die Sterilisationen in einem Intervall von 24 Stunden aufeinander folgen ließ und die Röhrchen in der Zwischenzeit bei Zimmertemperatur aufbewahrte. Ich benutzte die Formen No. 1, 7, 9, 13, 14, 18, 22 und 25. Mit den einzelnen Arten beimpfte ich je 12 Hefewasserröhrchen, von denen ich je eins 1, 2.... bis 12 mal an aufeinanderfolgenden Tagen sterilisierte. Eine genaue Untersuchung nach anschließender 14 tägiger Aufbewahrung im Brutzimmer ergab, daß die Röhrchen mit No. 1, 9, 13, 14, 25 bei mehr als 5 maliger, die mit No. 7, 18, 22 bei mehr als 6 maliger Sterilisation steril blieben.

Die größten Schwierigkeiten hatte es bisher immer gemacht, die Sterilisation bei Anwesenheit von Erde durchzuführen, d. h. wenn nicht eine einzelne, schwersterilisierbare Form in Reinkultur, sondern ein Gemenge verschiedener Bakterien vorlag. War meine Methode wirklich brauchbar, so durfte sie auch in diesem Falle nicht versagen. Ich machte die Probe, d. h. ich beimpfte und sterilisierte in der eben beschriebenen Weise Röhrchen mit Erdproben und zwar:

1. Mit Ackerboden des Göttinger landwirtschaftlich-bakteriologischen Instituts,
2. mit Lehm aus der Nähe von Osnabrück,
3. mit Ackerboden aus der Nähe von Osnabrück,
4. mit Wesermarsch aus der Nähe von Nienburg,
5. mit Marsch aus der Nähe von Oldenburg.

Es ergab sich, daß mehr als 7 mal sterilisierte Röhrchen stets steril blieben.

Demnach darf ich die Frage der Abtötung schwer sterilisierbarer Bakterien bei 100° durch genügende Erhöhung der Anzahl von Sterilisationen wohl als gelöst betrachten, während eine Verlängerung des Intervalls nur in wenigen Fällen zum Ziele führte. Dabei möchte ich nochmals betonen, daß diese Lösung sich einzig auf die auch der gewöhnlichen fraktionierten Sterilisation zugrunde liegende Tatsache gründet, daß nach jeder Sterilisation durch Abtötung der gekeimten Bakterien die Zahl der noch lebensfähigen Sporen vermindert ist, bis sie ganz verschwindet.

In welchem Maße diese Abnahme der Sporen vor sich geht, will ich zum Schluß noch durch einige Tabellen illustrieren. Es handelt sich um Sterilisationen im Zwischenraum von wenigen Stunden bei Aufbewahrung im Brutzimmer (30°) während der Zwischenzeit. Bei der ersten Versuchsreihe ließ ich 1, bezw. 2, 3 oder 4 mal 3 Stunden, bei der zweiten 1, bezw. 2 mal 6 Stunden und bei der dritten 1. bezw. 2 mal 12 Stunden zwischen den Sterilisationen so daß die erste Gruppe 2, bezw. 3, 4 oder 5 mal, die zweite und dritte 2, bezw. 3 mal sterilisiert wurden. Die Versuchsanordnung war dieselbe wie bei Versuch II, p. 28 ff., d. h. es wurden nach den einzelnen Sterilisationen in der dort beschriebenen Weise Agarplatten beimpft, auf denen dann das Kolonienwachstum beobachtet wurde.

Nur war die Art der Fragestellung insofern etwas anders, als es mir im vorliegenden Falle weniger darauf ankam, bis zur vollständigen Sterilisation zu gelangen, als möglichst genau den Grad der Sporenabnahme zu verfolgen. Wenn indessen diese letzte Frage bei dem oben erwähnten Versuche auch nicht im Vordergrund stand, so empfiehlt es sich doch, die dortigen Tabellen, besonders No. II, 5 hier zum Vergleich mit heranzuziehen. Bei diesem Versuche benutzte ich die Bakterien No. 1, 10, 19 und 27. Die Beobachtung der Platten setzte ich 10 Tage lang fort. Spätestens mit dem 7. Tage hörte indessen in allen Fällen das Wachtum neuer Kolonien auf. Setzt man jedoch hier den beschleunigenden Einfluß der Sterilisation für die Keimung in Rechnung, so darf man wohl annehmen, daß ohne dieses Erhitzen die Keimung frühestens am 8. Tage beendigt worden wäre.

Besonders die Tabelle No. IV, 9 zeigt gut, wie die Sporenzahl bei häufigerer Sterilisation zurückgeht. Die übrigen Tabellen sind auch insofern von Interesse, als aus ihnen hervorgeht, daß im Vergleich mit den Kurven 1—4 das Maximum der Sporenkeimung verschiedentlich anders liegt, als nach den Versuchen über zeitliche Verteilung der Sporenkeimung in unsterilisiertem Material zu erwarten war. Vermutlich ist das eine Folge des wiederholten Erhitzens.

Tabelle IV, 1—9.

1. Wachstum auf Platten, die mit Material aus zweimal mit dreistündigem Intervall sterilisierten Röhrchen beimpft wurden.

Nummer der Bakterien	Beobachtungstage							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	32	10	6	—	—	4	2	—
10	8	38	—	—	9	—	1	—
19	—	49	20	33	30	6	2	—
27	4	24	13	3	4	—	—	—

2. Beimpft aus dreimal mit dreistündigem Intervall sterilisierten Röhrchen.

Nummer der Bakterien	Beobachtungstage							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	—	19	—	1	2	1	—	—
10	—	14	4	7	7	1	—	—
19	—	11	25	36	17	4	3	—
27	—	9	—	—	6	—	—	—

3. Beimpft aus viermal mit dreistündigem Intervall sterilisierten Röhrchen.

Nummer der Bakterien	Beobachtungstage							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	—	—	2	6	3	5	3	—
	—	7	6	3	4	3	1	—
19	10	45	—	3	—	2	—	—
27	—	—	—	—	1	—	—	—

4. Beimpft aus fünfmal mit dreistündigem Intervall sterilisierten Röhrchen.

Nummer der Bakterien	Beobachtungstage							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	—	2	—	1	—	—	—	—
10	—	9	10	2	1	—	—	—
19	—	8	—	—	—	—	—	—
27	—	—	—	—	—	1	—	—

5. Beimpft aus zweimal mit sechsstündigem Intervall sterilisierten Röhrchen.

Nummer der Bakterien	Beobachtungstage							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	—	40	2	12	9	1	1	—
10	—	11	15	30	41	8	2	—
19	—	9	13	8	24	4	2	—
27	—	1	1	1	—	—	—	—

6. Beimpft aus dreimal mit sechsstündigem Intervall sterilisierten Röhrchen.

Nummer der Bakterien	Beobachtungstage							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	—	—	1	10	5	15	11	—
10	—	11	2	3	10	3	2	—
19	—	—	—	—	—	—	—	—
27	—	—	—	—	1	—	—	—

7. Beimpft aus zweimal mit zwölfstündigem Intervall sterilisierten Röhrchen.

Nummer der Bakterien	Beobachtungstage							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	—	27	15	9	2	1	—	—
10	—	13	7	10	5	2	1	—
19	—	7	15	7	11	3	1	
27	—	—	1	2	1			

8. Beimpft aus dreimal mit zwölfstündigem Intervall sterilisierten Röhrchen.

Nummer der Bakterien	Beobachtungstage							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	—	17	11	4	3	1	—	—
10	—	7	7	4	1	—	—	—
19	—	—	—	—	1	—	—	—
27	—	—	—	—	—	—	—	—

9. Gesamtwachstum bei den obigen acht Versuchsreihen.

Nummer der Bakterien	Versuchsreihen							
	3stündiges Intervall				6stünd. Intervall		12stünd. Intervall	
	2mal	3mal	4mal	5mal	2mal	3mal	2mal	3mal
1	54	23	19	3	65	42	54	36
10	56	33	24	22	107	31	38	19
19	140	96	60	8	60	—	44	1
27	48	15	1	1	3	1	4	—

Untersuchungen über Verlust und Zurückgewinnung der Resistenz.

Nach einigen Beobachtungen, die ich im Laufe dieser Arbeit zufällig machte, schien es, als ob die Schwersterilisierbarkeit eine nicht so konstante Eigenschaft wäre, wie man wohl hätte erwarten können. Dafür sprachen auch die auf p. 3 erwähnten Untersuchungen C. von Wahls, über die Vergrößerung der Resistenz durch den Einfluß von Erde. Tatsächlich machte ich denn auch die Erfahrung, daß das Medium für die größere oder geringere Widerstandsfähigkeit der Sporen von größter Bedeutung ist.

Wie ich schon oben erwähnte, habe ich die Bakterien No. 1—13 5 Monate länger bearbeitet, als die übrigen. Ich habe sie während dieser Zeit häufig in neue Röhrchen mit derselben Nährlösung weiter geimpft und dadurch immer neue Generationen erzielt. In einer anderen Versuchsreihe habe ich das Weiterimpfen immer auf Kartoffeln, also einem festen Nährboden, vorgenommen. In entsprechender Weise ging ich auch bei den übrigen Formen vor; nur war die Zahl der Umimpfungen und damit der aufeinanderfolgenden Generationen in diesem Falle der kürzeren Zeit halber natürlich gering.

Nach insgesamt 7 Monaten unterwarf ich dann beide Gruppen erneut der fraktionierten Sterilisation. Dabei ergab sich, daß jetzt alle Bakterien der ersten Gruppe und außerdem No. 14, 15, 21, 23 und 25 fraktioniert sterilisierbar geworden waren, jedoch nur, soweit sie im flüssigen Substrat gezogen waren. Die auf Kartoffeln kultivierten ließen sich nach wie vor nicht abtöten. Die in Flüssigkeit gezüchteten Bakterien mußten also entweder jetzt schneller keimen, oder ihre Sporen mußten die Widerstandsfähigkeit verloren haben. War das Nachlassen der Resistenz nur eine Folge beschleunigter Keimung, so mußten die Sporen nach wie vor eine einmalige Sterilisation bei 100° lebend überdauern. Lag der Grund hingegen in einer verminderten Widerstandsfähigkeit der Sporen, d. h. waren diese nicht mehr imstande, eine Temperatur von 100° zu ertragen, so mußten die betr. Formen in die Gruppe der durch einmalige Sterilisation abtötbaren Bakterien eingerückt sein.

Der Versuch ergab, daß die Bakterien einer einmaligen Sterilisation nicht mehr widerstanden. Folglich war die Widerstandsfähigkeit der Sporen gesunken.

Da eine Anzahl der Formen aus der 2. Gruppe auch schon leicht sterilisierbar geworden war, kann ich zusammenfassend wohl sagen, daß ein 2—5 Monate lang häufig wiederholtes Umimpfen schwer sterilisierbarer Bakterien in flüssigem Nährboden genügt, um ihnen die Resistenz gegen Temperaturen von 100° zu nehmen.

Wollen wir verstehen, wie das überhaupt möglich ist, so müssen wir noch einmal auf die Gründe der Resistenz gegen fraktionierte Sterilisation zurückkommen. Wir haben festgestellt, daß sie eine Folge der schleppenden Keimung ist. Dabei müssen wir uns aber darüber klar sein, daß die Keimungsverhältnisse allein vollkommen unwirksam sein würden, wenn sie sich nicht mit Eigenschaften der Sporen paarten, die diesen gestatteten, die Siedetemperatur ungeschädigt längere Zeit zu ertragen. Letzten Endes hätten wir uns also zu fragen, warum die Sporen der betreffenden Bakterien diese große Widerstandsfähigkeit haben. Berücksichtigt man dabei die Tatsache, daß allgemein Samen (10) und dergleichen, auch Bakterien und deren Sporen im angetrocknetem Zustande viel schwerer durch Hitze zu töten sind, als im durchfeuchteten, so liegt die Vermutung nahe, daß die resistenten Sporen vielleicht ihre Widerstandsfähigkeit einer besonders geringen Durchlässigkeit der Membran für Flüssigkeit verdanken könnten.

Besonders geeignet zum Studium dieser Widerstandsfähigkeit schienen mir Formen, von denen ich schwersterilisierbare Rassen neben solchen hatte, die infolge wiederholten Umzüchtens, ihre Schwersterilisierbarkeit verloren hatten. Ließen sich zwischen beiden Unterschiede feststellen, so war anzunehmen, daß es sich dabei um Eigenschaften handelte, die für die Schwersterilisierbarkeit von wesentlicher Bedeutung sind.

Es gelang mir nun tatsächlich, in mehreren Versuchen eine Verschiedenheit im Verhalten der Sporenmembran bei beiden Gruppen nachzuweisen:

I. Ich verglich die Färbbarkeit der Sporen beider Gruppen durch Karbolfuchsin. Dabei durfte ich die Sporen natürlich nicht in der sonst üblichen Weise durch Erhitzen farbdurchlässig machen. Ich zog die Deckgläschen vielmehr nur zum Fixieren dreimal durch die Flamme und ließ die Farbe dann ohne Erwärmen auf dem Deckglas einwirken. Naturgemäß drang die Farbe dabei auch bei den leicht sterilisierbaren Gruppen nur langsam ein. Das Ergebnis war nach 9 Stunden folgendes:

a) Leicht sterilisierbar.
No. 1. Die Sporen sind rosa gefärbt.
No. 10. Die Sporen sind ausgesprochen rot.
No. 19. Die Sporen sind rosa.
No. 26. Die Sporen sind dunkelrot.

b) Schwer sterilisierbar:
No. 1 ungefärbt.
No. 10 „
No. 19 „
No. 26 soeben beginnende Färbung.

Zwischen beiden Gruppen zeigten sich also deutliche Verschiedenheiten, die auf eine größere Durchlässigkeit der Membran bei a) schließen lassen. Das trat bei dem nächsten Versuch noch klarer hervor.

II. Nachdem ich die Einwirkung der Farbe 24 Stunden lang fortgesetzt hatte, waren alle Sporen von a) und b) vollständig durchgefärbt. Darauf

ging ich zur Entfärbung über unter Benutzung von Säure-Alkohol (Alkohol + 1 Proz. Schwefelsäure). Dabei hielten die Sporen bei b) die Farbe vollständig, während sie bei a) nach 30—50 Sekunden verloren ging. Also ein Analogon zu den Unterschieden, die sonst zwischen Sporen und vegetativen Bakterien bestehen. Offenbar fand der Säure-Alkohol bei b) keinen Eingang.

III. Zu dem gleichen Ergebnis führte ein 3. Versuch. Ich brachte Sporen von a) und b) auf je einem Objektträger unter 2 Mikroskope, setzte beiden Präparaten dann gleichzeitig einen Tropfen Eau de Javelle zu und beobachtete, wann eine deutliche Verquellung der Sporenmembranen wahrzunehmen war. Das geschah bei Formen der Gruppe a) durchschnittlich nach 10—15 Min., bei denen der Gruppe b) nach 40—50 Min. Augenscheinlich war also wiederum die Gruppe b) die widerstandsfähigere.

Zusammenfassend, ließe sich also sagen, daß, aller Wahrscheinlichkeit nach, die größere Widerstandsfähigkeit der Sporen schwersterilisierbarer Bakterien gegen Temperaturen von 100° eine Folge geringerer Durchlässigkeit der Sporenmembranen ist.

Es läßt sich ja auch sehr gut vorstellen, daß durch größeren Wasserreichtum des Substrats die Membran lockerer und damit wasserdurchlässiger gemacht werden kann. Das ist aber ein Ergebnis von großer Tragweite auch in anderer Hinsicht. Der Keimungsprozeß steht nämlich mit dem Grade der Durchlässigkeit gleichfalls in engem Zusammenhange. Zu Beginn der Keimung treten durch die Sporenwandung Wasser und Nährstoffe in das Innere. Eine Quellung setzt ein und führt schließlich zum Zerreißen der Membran. Ist nun eine Sporenmembran besonders wenig wasserdurchlässig, so wird der Eintritt des Wassers nur langsam erfolgen. Mithin kann dann aber auch die Keimung erst später eintreten, als bei Formen mit leicht durchlässiger Membran. Somit wäre die langsame Keimung der resistenten Formen eine natürliche Folge der geringen Durchlässigkeit der Sporenmembranen. An sich würden diese Tatsachen wahrscheinlich imstande sein, auch eine Erklärung für die verminderte Widerstandsfähigkeit der in Flüssigkeit gezogenen Formen zu liefern. Infolge des schnelleren Eindringens von Wasser durch die durchlässiger gewordenen Membranen wird vermutlich eine Beschleunigung des Keimungsprozesses erzielt. Die Bakterien könnten dadurch also u. U. der fraktionierten Sterilisation zugänglich werden.

Für die Praxis haben diese Vorgänge aber keine Bedeutung, da ja, wie ich p. 34 ausführte, die Sporenmembranen so geschwächt sind, daß die Sporen schon bei der ersten Sterilisation getötet werden, so daß es zu einer Keimung überhaupt nicht kommt.

Jetzt glaube ich auch, die Erklärung für die auf p. 28 erwähnte Beschleunigung der Keimung durch Aufkochen geben zu können. Es werden dabei die Sporenmembranen mürber werden, das Wasser wird leichter eindringen können, und damit wird in der schon erwähnten Weise der ganze Keimungsprozeß schneller ablaufen. Das Erhitzen in Flüssigkeit wird also dieselbe Bedeutung haben wie das trockene Erhitzen bei Sporenfärbung: die Sporenmembran wird durchlässiger gemacht.

Die Bedeutung des Mediums für die Resistenz der Sporen geht aber noch weiter; ist es doch sogar möglich, leicht sterilisierbar gewordene Bakterien wieder resistent zu machen. Hierher gehören die schon mehrfach erwähnten Versuche v. Esmarchs und Wahls, welche den Bakterien durch Antrocknen auf Erde ihre Resistenz zurückgaben. Ich selbst kam zu ähnlichen Ergebnissen.

Ich sterilisierte Ackererde, Sand und Kaolin im Autoklaven und ließ dann Sporen der leicht sterilisierbar gewordenen Bakterien darauf antrocknen. In allen Fällen wurden sie nach wenigen Wochen wieder resistent gegen fraktionierte Sterilisation.

Jedenfalls beansprucht diese Eigenschaft der Erde und erdiger Stoffe großes Interesse. Offenbar beruht hierauf das häufige Vorkommen schwersterilisierbarer Formen in Erde. Mir scheint es sogar, daß man nicht die Möglichkeit von der Hand weisen dürfte, daß vielleicht viele, aus beliebigen flüssigen Substraten isolierte, leicht sterilisierbare Bakterien mit resistenten Erdformen identisch, nur durch die Vorgeschichte in diesem einen Punkte abgewandelt wären. Sollte sich diese Vermutung als stichhaltig erweisen so müßte es also möglich sein, umgekehrt, wie ich resistenten Formen ihre Widerstandsfähigkeit nahm, auch leicht sterilisierbare durch dauernde Kultur in erdigen Substraten in schwer sterilisierbare umzuzüchten. Das würde aber nicht weniger bedeuten, als daß eine systematische Trennung schwer und leicht sterilisierbarer Bakterien tatsächlich nicht durchführbar wäre.

Einfluß von Sauerstoff auf die Bakterienkeimung.

Nach den gewonnenen Ergebnissen könnte man auf den Gedanken kommen, daß das von mir vorgeschlagene vieltägige Sterilisationsverfahren geeignet wäre, auch in der Praxis, speziell im Haushalt, angewandt zu werden. Das ist jedoch nicht in allen Fällen angängig.

Durch ihr ganzes physiologisches Verhalten hatten die hier untersuchten Bakterien sich als ausgesprochen aërobiotisch erwiesen. So kam ich auf die Vermutung, ob sie nicht, wie viele andere aërobiotische Formen, bei Verringerung des Sauerstoffs die Keimung einstellen würden. War das der Fall, so ließ sich damit die an sich doch auffällige Tatsache der guten Haltbarkeit von Konserven in Weckgläsern und ähnlichen Gefäßen nach nur einmaliger Sterilisation (11) erklären. Denn da bei diesen der Gummiverschluß wohl ein Entweichen der Luft beim Erhitzen, nicht aber einen Wiedereintritt derselben beim Erkalten gestattet, entsteht über den konservierten Nahrungsmitteln ein luftverdünnter Raum, der die Keimung der noch vorhandenen Sporen unmöglich macht.

Um mir darüber Klarheit zu verschaffen, setzte ich 3 Versuche an:

I. Ich impfte Sporen sämtlicher Formen in Bouillon, der ich etwas Methylenblau zusetzte. Dann überschichtete ich die Flüssigkeit in allen Röhrchen hoch mit Paraffin. Das Methylenblau benutzte ich als Indikator; es wird bei Abwesenheit von Sauerstoff durch Wasserstoffanlagerung entfärbt. Nach einigen Tagen war diese Entfärbung fast vollständig eingetreten, Sauerstoff mithin nur noch in Spuren vorhanden. Die Keimung blieb vollständig aus, während sich in Parallelkulturen ohne Paraffinschicht bald lebhaftes Wachstum zeigte.

II. Die mit Sporen beimpften Bouillonröhrchen wurden in ein geeignetes Gefäß gebracht, das ich dann unter Benutzung einer Wasserstrahlluftpumpe bis auf 56 mm Hg Druck auspumpte. Nach 14 Tagen war noch keine Keimung eingetreten bei einer Temperatur von 35°. Als ich die Röhrchen dann herausnahm und in der gewöhnlichen Atmosphäre ins Brutzimmer stellte, wurde schon in 24 Stunden eine Kahmhaut gebildet.

III. Um den Sauerstoff vollständig zu entfernen, brachte ich die beimpften Bouillonröhrchen in ein Gefäß nach Omelianski, in dem ich gleichzeitig etwas Pyrogallussäure mit Kalilauge zusammengeschüttet hatte. Der Verschluß geschah durch einen aufgeschliffenen Deckel, der auch noch mit Quecksilber umgeben wurde. Auch diesmal blieb das Wachstum gänzlich aus.

Danach darf ich wohl annehmen, daß die untersuchten Bakterien tatsächlich nur bei Gegenwart von Sauerstoff keimen.

Das ist aber für die praktische Anwendbarkeit meiner Versuche von größter Bedeutung. Die von mir vorgeschlagene vieltägige Sterilisationsmethode ist dadurch nämlich in all den Fällen nicht brauchbar, wo die Sterilisation in Gefäßen geschieht, deren Konstruktion ein Entweichen von Luft während des Erhitzens und damit das Entstehen eines luftverdünnten Raumes über den Konserven, gestattet, also z. B. in den erwähnten Weckgläsern. Schon nach 1 maliger Sterilisation wird dort nämlich die Keimung der noch vorhandenen Sporen wegen Sauerstoffmangel unterbleiben. Eine relative Sterilisation, d. h. eine Verhinderung der Zersetzung, wäre damit erreicht. Bis zur absoluten Sterilisation, d. h. zur Abtötung alles vorhandenen Bakterienmaterials, wird man aber nie gelangen, weil das Erhitzen beliebig oft wiederholt werden kann, ohne daß die resistenten Sporen getötet werden, weil sie nicht keimen können.

Zusammenstellung der Resultate.

Zum Schluß möchte ich noch einmal die im Laufe der Arbeit gewonnenen Ergebnisse zusammenstellen:

1. Nicht in allen Bodenarten kommen schwer sterilisierbare Bakterien vor. Die Gründe für ihr Fehlen an manchen Stellen konnte ich nicht ermitteln. Meine ursprüngliche Vermutung, daß ein Boden, in welchem sie fehlten, vielleicht saurer wäre, als die anderen, erwies sich als nicht stichhaltig.

2. Da die aufgefundenen Formen in wesentlichen Punkten Übereinstimmung zeigen, gehören sie anscheinend zu einem Kreise von Formen, welche physiologisch verwandt sind, auch in räumlich weiter getrennten Gebieten.

3. Auch durch ein recht beträchtliches Alter trocken aufbewahrter Sporen — 13 Jahre — werden Keimkraft und Resistenz nicht beeinflußt.

4. Die Schwersterilisierbarkeit liegt darin begründet, daß die widerstandsfähigen Sporen erst spät mit der Keimung beginnen, oder daß die Keimung sich über einen langen Zeitraum erstreckt. Gelegentlich kann auch Sporenneubildung beteiligt sein.

5. Der einfachste Weg, der eine völlige Abtötung der Bakterien gewährleistet, ohne daß die Temperatur von 100° überschritten wird, ist eine mindestens 7 malige Sterilisation an aufeinanderfolgenden Tagen unter Aufbewahrung bei Zimmertemperatur während der Zwischenzeit.

6. Die größere Widerstandsfähigkeit der Sporen schwersterilisierbarer Bakterien hat ihren Grund in geringerer Durchlässigkeit der Membranen.

7. Nach häufigem Umimpfen in Flüssigkeit — die erforderliche Zeit schwankt zwischen 2 und 5 Monaten — geht die Resistenz der Sporen verloren. Auf festem Nährboden bleibt sie erhalten. Das erklärt sich durch die unter dem Einfluß flüssiger Substrate allmählich gewonnene Durchlässigkeit der Sporen, welche einerseits die Keimung beschleunigt, andererseits die Abtötbarkeit der Sporen erleichtert.

8. Bei Antrocknen der Sporen auf Erde, Sand oder Kaolin gewinnen sie in wenigen Wochen die Resistenz zurück.

9. Die untersuchten Formen sind stark aërobiotisch. Durch Herabsetzung der Sauerstoffspannung läßt sich die Keimung verhindern. Doch werden die

Sporen dabei nicht geschädigt, sondern keimen, sobald der Druck wieder auf die ursprüngliche Höhe gebracht wird. Dadurch wird die Methode praktisch unanwendbar in allen Fällen, wo während der Sterilisation ein Entweichen von Luft möglich ist.

Literatur.

1. Benecke, Bau und Leben der Bakterien. S. 209.
2. Blau, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 15. p. 97.
3. Christen, Mitteil. a. d. Klinik. d. Schweiz. 3. Reihe. 1895. H. 2.
4. Eisenberg, Bakteriologische Diagnostik.
5. Engberding, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 23. p. 569.
6. v. Esmarch, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 5. 1888. p. 67.
7. Flügge, Mikroorganismen.
8. Globig, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 3. 1888. p. 294 u. 322.
9. Hesse u. Niedner, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 29. p. 454.
10. Kehler, [Dissert.] Königsberg 1904.
11. A. Koch, In Lafár, Handb. d. Mykol. Bd. 2. p. 440.
12. Lehmann u. Neumann, Atlas und Grundriß der Bakterien.
13. C. v. Wahl, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 16. 1906. p. 489.

Anmerkungen zu den Tafeln.

1. Die Nummern bei den Abbildungen der Bakterien entsprechen den Nummern bei der Beschreibung im Text.

2. Die zweite Tafel No. 1—28 umfaßt Abbildungen der auf Gelatineplatten gewachsenen Kolonien, soweit sie irgendwie bemerkenswert waren. Alle sind schwach vergrößert. Nur 19 b ist auf einer Agarplatte gewachsen; natürliche Größe. 19 a, I ist eine Oberflächen-, 19 a II eine Tiefenkolonie.

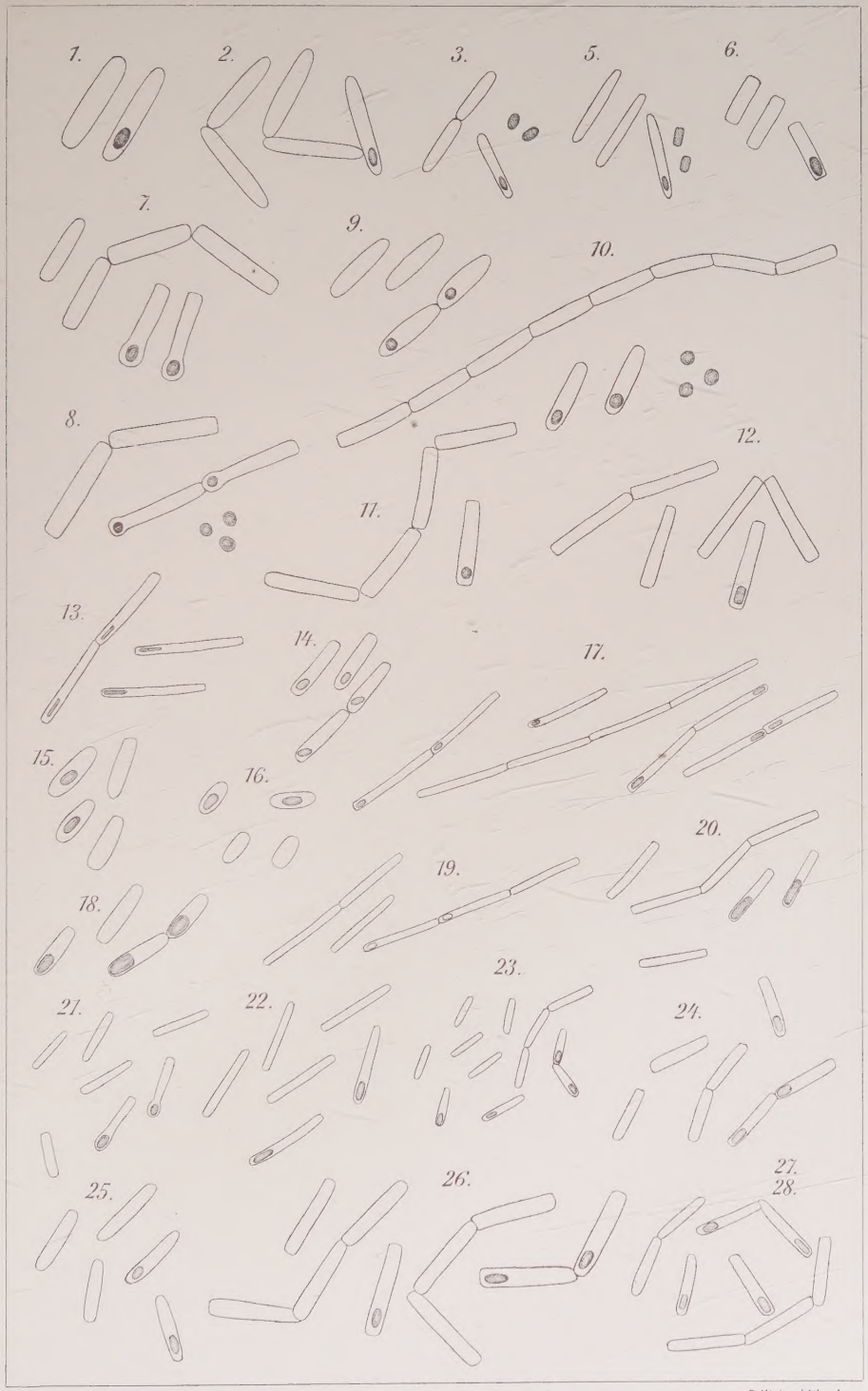
Lebenslauf.

Als Tochter des Mittelschullehrers Rudolf Eckelmann wurde ich am 22. August 1892 zu Osnabrück geboren. Ich bin preußische Staatsangehörige. Nachdem ich meine Schulbildung von 1898 bis 1908 auf mittleren und höheren Mädchenschulen meiner Vaterstadt erhalten hatte, besuchte ich von 1908 bis 1911 das dortige höhere Lehrerinnenseminar und bestand Ostern 1911 das Lehrerinnenexamen für mittlere und höhere Lehranstalten. Bis Herbst 1912 bereitete ich mich dann auf die realgymnasiale Reifeprüfung vor, die ich als Externe am Realgymnasium zu Osnabrück bestand. Während eines großen Teiles der Zwischenzeit hatte ich gleichzeitig in Vertretung eines Oberlehrers am Lyzeum zu Osnabrück unterrichtet. Im Wintersemester 1912/13 begann ich mein Studium in Münster, ging dann Ostern 1913 nach Marburg, Ostern 1914 nach Freiburg. Bei Kriegsausbruch unterbrach ich mein Studium, um wieder in Vertretung eines Oberlehrers in den Schuldienst am Lyzeum und Oberlyzeum meiner Vaterstadt zu treten. Mit dem Sommersemester 1915 bezog ich indessen wieder die Universität Göttingen, wo ich seither geblieben bin.

Meine Lehrer in den von mir zum Examen angemeldeten Fächern waren in Bakteriologie: Prof. A. Koch, in Botanik: die Professoren Correns, A. Meyer, Oltmanns und Berthold, in Chemie: die Professoren Salkowski, v. Auwers, Wallach und Windaus.

Ihnen allen danke ich für die Anregungen, die sie mir gegeben haben; besonders aber Herrn Prof. Koch für die vielfachen Beratungen und Unterstützungen bei meiner Arbeit.

Elisabeth Eckelmann.



Verlag von **Gustav Fischer** in Jena.

P. Weise, Lith., Jena.